



Méthodes d'analyse de surface appliquées à l'étude de protéines

Laurence Martel

► To cite this version:

| Laurence Martel. Méthodes d'analyse de surface appliquées à l'étude de protéines. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2002. Français. <tel-00006293>

HAL Id: tel-00006293

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006293>

Submitted on 21 Jun 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble 1

Discipline : Physique

Soutenue publiquement le 19 décembre 2002 par

Laurence MARTEL

Méthodes d'analyse de surface appliquées à l'étude de protéines d'adhérence cellulaire

Membres du jury

Président	Jean VICAT
Rapporteurs	Jacques MEUNIER Raymond OBER
Examinatrices	Danielle GULINO Anne RENAULT
Directeur de thèse	Jean-François LEGRAND

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'y avoir apporté un regard critique très enrichissant : Raymond Ober et Jacques Meunier, rapporteurs, Jean Vicat, président du jury, ainsi que Danielle Gulino et Anne Renault.

Je remercie Jean-François Legrand, directeur du Laboratoire SPram de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir proposé ce sujet de thèse, jugé risqué par certains côtés, mais toujours séduisant. Au cours de ces quatre années, j'ai pu apprécier sa patience, ses conseils avisés et surtout son optimisme infailible. Il m'a permis de travailler à l'ESRF, de monter ma propre manip de laboratoire et de découvrir le monde de la biologie, et je lui en suis très reconnaissante.

De manière générale, je tiens à remercier chaleureusement toutes celles et ceux qui m'ont aidée au long de cette thèse à différents niveaux. En particulier :

Je salue tout le groupe d'Urbana-Champaign avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, notamment lors de nuits sympathiques à l'ESRF : Deborah Leckband dont j'ai beaucoup apprécié la rigueur et la détermination, Sanjeevi Sivasankar, Colin Johnson, Ian Robinson, Sébastien Boutet et les autres. Je remercie tout spécialement Sanjeevi qui m'a beaucoup appris sur les cadhérines et le monde de la recherche, et surtout qui m'a apporté sa méthode de travail de Biophysicien. Merci pour ton aide, ton accueil chaleureux à Urbana, nos discussions en attendant la fin des manips, et ce petit accent indien dans mon anglais, paraît-il...

Un travail expérimental n'est possible que grâce à l'aide précieuse des techniciens. Merci à Roger Sabbia, Jacques Sérose, Patrice Ballet, Gilles Albert, Bruno Corso et Alexandre Thaumoux pour leur disponibilité et leur aide, surtout dans les moments d'urgence!

Cette étude n'aurait pas pu se faire sans une collaboration avec des biologistes. Je remercie tous ceux qui m'ont appris les bases nécessaires d'une manipulation correcte de ces objets très fragiles que sont les protéines : Danielle Gulino, Rana Al-Kurdi, Stéphanie Bibert, Evelyne Concord, Thierry Vernet, Thierry Livache. Merci particulièrement à Danielle Gulino d'avoir lu et relu ce manuscrit et qui a toujours été de bon conseil. J'en profite pour saluer tout le groupe de travail PCV sur les cadhérines, dont les réunions étaient toujours très enrichissantes. Merci aussi à Sébastien Courty pour sa disponibilité, sa gentillesse et son enthousiasme, de l'I.B.S. à Spectro.

Je remercie tous les chercheurs et étudiants d'EMSI, de PCI, de PCM, de PMS ou du groupe théorie que j'ai croisés entre le 2ème et le 4ème étage du C5, et qui ont fait de ma thèse un passage agréable au laboratoire. Merci spécialement à Roberto Calemczuk grâce à qui le SPR a finalement trouvé un plasmon et avec lequel j'ai eu des discussions passionnantes, à François Rieutord pour ses conseils et sa gentillesse légendaire parmi les thésards et à Oleg Konovalov pour sa disponibilité et son aide pour toutes nos expériences à l'ESRF (Спасибо за твои пожелания!). Merci également à Catherine Pascal pour son aide et nos discussions en attendant le chef.

Enfin, un grand merci à tous les thésards et étudiants que j'ai croisés au cours de ces années et qui m'ont beaucoup aidée, sans le savoir parfois : Enno, Nadège, Guillaume, Laurent(s), Moeava, Stéphanie, Stéphane, Raphaël, Lorenzo, Sylvain, Antonella et l'ADoP, Albéric, Romain, Marie-Laure, Estelle, Laurence, Alina(s), Frank, Denis et la joyeuse bande d'Hercules, Alice, Daniel, Vladimir, François, Virginie, et à tous ceux que j'oublie de citer à l'instant... Bonne continuation à tous!

Sommaire

Remerciements	i
Sommaire	iii
Liste des abréviations.....	v
Chapitre I Introduction.....	1
Chapitre II Adhérence cellulaire et monocouches de protéines	3
II.1 Molécules d'adhérence cellulaire.....	3
II.1.1 <i>L'adhérence cellulaire</i>	3
II.1.2 <i>Les cadhérines classiques</i>	6
II.1.3 <i>Relations structure - fonction des cadhérines</i>	8
II.1.4 <i>Les cadhérines étudiées</i>	16
II.2 Monocouches de protéines	19
II.2.1 <i>Elaboration d'une monocouche de protéines</i>	20
II.2.2 <i>Lipides</i>	22
II.2.3 <i>Concentration en calcium des solutions</i>	26
II.2.4 <i>Cellules-échantillons</i>	29
II.3 Conclusion	30
Chapitre III Présentation des expériences	33
III.1 Equations communes	33
III.1.1 <i>Description par les matrices d'Abélès</i>	34
III.1.2 <i>Expressions développées exactes des coefficients r_s et r_p</i>	37
III.1.3 <i>La rugosité</i>	37
III.1.4 <i>Une autre description des coefficients de réflexion</i>	38
III.2 Programmes d'analyse des données.....	39
III.2.1 <i>Programme Parratt32</i>	40
III.2.2 <i>Programme RefX de R. Ober</i>	40
III.2.3 <i>Conclusion</i>	41
III.3 Descriptions des techniques expérimentales.....	41
III.3.1 <i>Réflectivité des rayons X</i>	42
III.3.2 <i>Ellipsométrie</i>	52
III.4 Analyse des données expérimentales	64
III.4.1 <i>Réflectivité des rayons X</i>	64
III.4.2 <i>Ellipsométrie</i>	66
III.4.3 <i>Cas de la protéine HupR</i>	70
Chapitre IV Structures des monocouches de cadhérines et interactions dépendantes du calcium	71
IV.1 Lipides seuls	71
IV.1.1 <i>Lipides ligands Ni-NTA-DLGE</i>	72

IV.1.2	Mélange de lipides diluants DOPS:DOPE (1:7)	75
IV.1.3	Conclusion	77
IV.2	Etude du fragment C-EC1-5His de C-cadhérine	78
IV.2.1	Interaction non-spécifique	79
IV.2.2	Effets de la concentration initiale en calcium	82
IV.2.3	Dissociation de complexes de C-cadhérines	102
IV.2.4	Interactions entre fragments extracellulaires de C-cadhérine	118
IV.2.5	Conclusion de l'étude du fragment C-EC1-5His de C-cadhérine	124
IV.3	Etude du fragment VE-EC1-4His de VE-cadhérine	127
IV.3.1	Interaction non-spécifique	129
IV.3.2	Etude ellipsométrique de monocouches du fragment VE-EC1-4His	132
IV.3.3	Etude structurale d'interactions entre fragments de VE-cadhérine par réflectivité	150
IV.3.4	Conclusion sur l'étude du fragment VE-EC1-4His	161
IV.4	Conclusion	162
Chapitre V	Caractérisation de films minces par résonance des plasmons de surface	167
V.1	Présentation	167
V.1.1	Pourquoi un SPR ?	167
V.1.2	Assemblages de macromolécules sur substrats solides	168
V.1.3	L'appareil de mesure de la résonance des plasmons de surface	168
V.2	Résonance des plasmons de surface	169
V.2.1	Existence des plasmons de surface	169
V.2.2	Comment exciter un plasmon de surface	169
V.2.3	Simulations de courbes de résonance des plasmons de surface	171
V.3	Réalisation d'un appareil de mesure de la résonance des plasmons de surface	173
V.4	Applications : détection de multicouches organiques	176
V.4.1	Immobilisation d'avidine sur un film de polypyrrole biotinylé	176
V.4.2	Multicouches de chitosane-ADN	178
V.5	Projets futurs	181
Chapitre VI	Conclusions et perspectives	183
Annexe 1	Les molécules d'adhérence cellulaire	189
Annexe 2	Structures cristallographiques de cadhérines	191
Annexe 3	Interaction rayonnement-matière	195
Annexe 4	Estimation de la masse de protéines adsorbée dans une monocouche	199
Annexe 5	Autres molécules étudiées	203
Publications		205
Bibliographie		207

Liste des abréviations

A.F.M. : Atomic Force Microscopy
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNdb : ADN double brin
C.A.M. : Cell Adhesion Molecule (molécule d'adhérence cellulaire)
Da : Dalton
E. Coli : *Escherichia coli*
E.S.R.F. : European Synchrotron Radiation Facility
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGTA : Acide Ethylène Glycol Tétracétique
GID : Grazing Incidence Diffraction
I.B.S. : Institut de Biologie Structurale
I.O.T.A. : Institut d'Optique Théorique et Appliquée
ID : Insertion Device
Mw : Molecular weight (masse molaire)
PBS : Phosphate Buffered Saline
PSD : Position Sensitive Detector
RefX : Programme d'analyse des données de réflectivité X [Bardon 1999]
SPR : Surface Plasmon Resonance
Tris : Tri-hydroxyméthyl-aminométhane
U.I.U.C.: University of Illinois in Urbana-Champaign
VE : Vascular Endothelium

Chapitre I Introduction

L'immobilisation de protéines à l'interface air-eau ou sur une surface solide par greffage sur une monocouche de lipides permet de construire une monocouche de protéines orientées par rapport à la surface. Cette technique a été initialement développée dans le but d'obtenir des arrangements cristallins de protéines à deux dimensions. Si elles ne s'organisent pas en cristal bidimensionnel, les protéines sont susceptibles d'interagir entre elles ou avec d'autres molécules présentes en solution. Nous nous sommes intéressés à ce second type de monocouches de protéines afin de disposer d'un système modèle adapté à l'étude des interactions entre protéines.

L'objet de notre étude est le développement de méthodes d'analyse des monocouches de protéines permettant de mettre en évidence des changements de densité ou d'épaisseur au sein de la monocouche, résultant d'interaction entre les protéines qui constituent la monocouche ou avec d'autres molécules. Nous nous sommes intéressés particulièrement à trois techniques expérimentales. La réflectivité des rayons X permet d'obtenir un profil de densité électronique perpendiculaire au plan de la couche et de connaître la densité de surface de la monocouche. L'ellipsométrie est une technique optique permettant de suivre en temps réel l'adsorption des protéines à la monocouche de ligands et d'estimer la densité de surface des monocouches. Ces techniques sont bien adaptées à l'étude des monocouches déposées à la surface de l'eau. La résonance des plasmons de surface permet d'obtenir des informations similaires à l'ellipsométrie dans le cas des monocouches élaborées sur une surface solide.

Nous nous sommes tournés vers l'étude des protéines responsables de l'adhérence cellulaire pour lesquelles ce système d'immobilisation mime la surface des cellules. En effet, l'établissement de l'adhérence entre deux cellules repose sur les interactions entre les parties extracellulaires de protéines transmembranaires, appelées protéines d'adhérence cellulaire. L'ancrage à une monocouche lipidique de ces protéines permet de les orienter de la même manière qu'à la surface de la cellule. Il existe plusieurs familles de protéines d'adhérence cellulaire parmi lesquelles se trouve la famille des cadhérines. Le mécanisme moléculaire des interactions entre les molécules de cadhérines est actuellement controversé, bien que l'obtention de structures cristallographiques de certaines parties de cadhérines ait permis de formuler des hypothèses sur leurs interactions. Ainsi, la forma-

tion de complexes de cadhérines pourrait impliquer une partie extracellulaire plus ou moins grande.

Afin d'obtenir des informations sur les interactions entre les domaines extracellulaires de cadhérine, nous avons immobilisé des fragments composés uniquement de la partie extracellulaire de cadhérine à l'interface air-eau dans une orientation similaire à celle des cadhérines par rapport à la surface cellulaire. Des collaborations avec deux équipes de biologistes nous ont apporté les compétences nécessaires à la réalisation de ce projet. Ce sont les équipes de Danielle Gulino de l'Institut de Biologie Structurale à Grenoble et de Deborah Leckband de l'Université d'Illinois à Urbana-Champaign aux Etats-Unis.

Notre objectif était de caractériser l'adsorption des protéines aux lipides et les variations de densité consécutives à des changements opérés au sein de la couche protéique. Nous avons cherché d'une part, à obtenir par ellipsométrie des informations quantitatives permettant de suivre des changements faibles de densité de surface, et d'autre part, à mettre en évidence par réflectivité X des modulations du profil de densité due à des interactions entre les protéines. Enfin, pour étudier des monocouches de protéines greffées sur une surface solide, nous avons réalisé un appareil de résonance des plasmons de surface.

Dans le Chapitre II, nous présenterons les molécules d'adhérence cellulaire, en particulier les cadhérines. Nous exposerons les questions actuelles relatives à leurs interactions, puis les deux protéines qui ont servi de modèle à notre étude, la C-cadhérine et la VE-cadhérine. Nous détaillerons enfin la technique d'élaboration des monocouches de protéines. Deux méthodes expérimentales et d'analyse utilisées dans ce travail, la réflectivité X et l'ellipsométrie, seront présentées dans le Chapitre I. Le Chapitre IV sera consacré aux résultats et conclusions de l'étude des monocouches de cadhérine, concernant d'abord la C-cadhérine, puis la VE-cadhérine. Nous présentons dans le Chapitre V la résonance des plasmons de surface et les intérêts de cette méthode pour l'étude des monocouches de protéines greffées sur surfaces solides. Nous concluons cette étude et présenterons des perspectives de travail dans le Chapitre VI.

Chapitre II Adhérence cellulaire et monocou- ches de protéines

II.1 Molécules d'adhérence cellulaire

II.1.1 L'adhérence cellulaire

Dans un organisme, les cellules sont spécialisées et capables de communiquer entre elles et de se reconnaître (voir par exemple Alberts 1994). Certaines adh rent entre elles pour former des tissus et interagissent avec la matrice extracellulaire. D'autres se déplacent et sont capables d'interagir de manière spécifique avec différents types cellulaires, comme c'est le cas de la famille des globules blancs (ou leucocytes). Tous ces contacts sont effectués par des interactions entre des protéines situées sur la membrane cellulaire et appelées de manière générale "récepteur d'adhérence". Une association de récepteurs d'adhérence est appelée "jonction". De manière générale, les jonctions entre cellules sont regroupées en trois groupes : les jonctions étanches, les jonctions de communication, les jonctions adhérentes.

L'endothélium vasculaire est un bon exemple d'assemblage de cellules en interaction. Ce tissu tapisse les parois des vaisseaux sanguins. Il joue un rôle dans le contrôle de la circulation sanguine et la coagulation du sang. Il se comporte comme une barrière semi-perméable permettant le passage des leucocytes du sang vers les foyers infectieux. Il est formé par une monocouche de cellules endothéliales liées les unes aux autres sur le côté et séparant l'intérieur du vaisseau (côté luminal) de la matrice extracellulaire (côté abluminal).

Il existe trois types de jonctions entre les cellules de l'endothélium vasculaire [Troyanovski 1999] indiqué sur la Figure 1 et la Figure 2 :

- Des jonctions " tanches" (*tight junction* ou *zonula occulens*) imperm abilisent l'intérieur du vaisseau et sont constituées par des protéines appelées occludines et claudines.
- Les jonctions "adhérentes" (*adhesive junction* ou *zonula adherens*) forment une ceinture autour des cellules et permettent la fixation des filaments d'actine. Elles sont principalement établies par des protéines de la famille des cadhérines.

- Les jonctions dites de communication (*gap junction*) contrôlent le passage des ions ou de petites molécules (<1kDa) entre les cellules. La circulation est effectuée par l'intermédiaire de canaux constitués de protéines organisées en hexamères, les connexines.

Des interactions avec la matrice extracellulaire ou avec des cellules de types différents sont effectuées par d'autres catégories de protéines : les intégrines pour la matrice extracellulaire et les interaction lymphocyte¹-endothélium et les sélectines pour l'interaction leucocyte-endothélium.

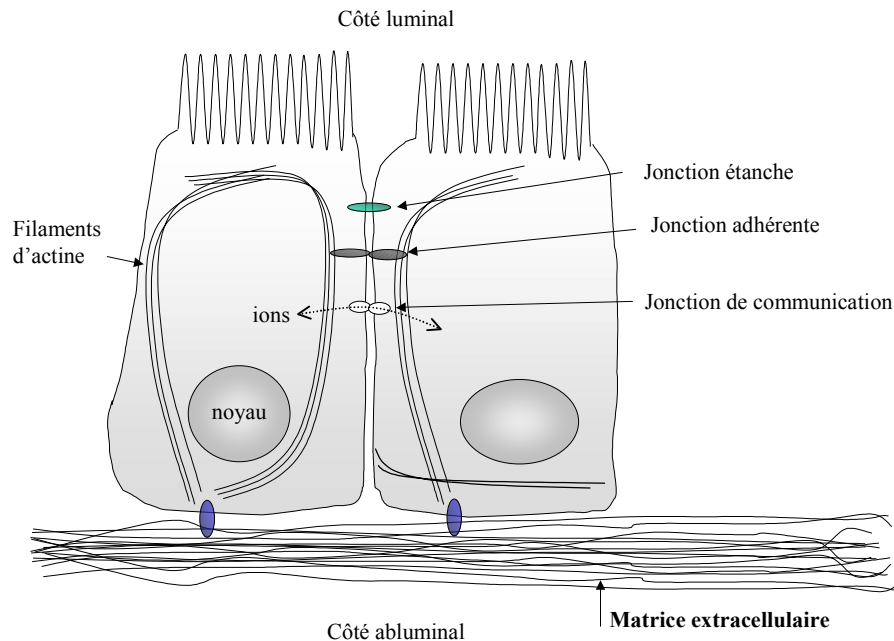


Figure 1 : Schéma représentant deux cellules de l'endothélium vasculaire et reconstitué d'après [Alberts 1994] et [Bershadsky 1999]. Les trois types de jonctions entre les cellules sont indiqués en partant du côté luminal : jonctions étanches, jonctions adhérentes, jonctions de communication.

Les récepteurs d'adhérence cellulaire sont des glycoprotéines appelées aussi CAM, de l'anglais *cell adhesion molecule*. A ce jour, ces protéines sont regroupées en cinq familles selon leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles : les cadhérines, la super-famille des immunoglobulines, les sélectines, les intégrines et les protéoglycans [Gumbiner 1996, Hunt 1996]. Selon leur famille d'appartenance, elles établissent des jonctions entre deux cellules de type identique ou non. Les interactions entre CAM peuvent être soit homotypiques, c'est-à-dire qu'elles se lient à une molécule de même type, soit hétérotypiques dans le cas où les deux protéines impliquées sont différentes. Les CAM n'ont pas seulement un rôle adhérent, elles régissent également une activité de signalisation dans la cellule [Hunt 1996].

Le premier membre de la famille des cadhérines a été décrit au début des années 1980 et un grand nombre de cadhérines a été découvert par la suite [Angst

¹ Lymphocyte = une famille de cellules faisant partie des globules blancs.

2001]. Ces récepteurs d'adhérence sont exprimés dans la plupart des types cellulaires et une cellule peut exprimer un ou plusieurs types de cadhérine en proportions différentes [Takeichi 1991].

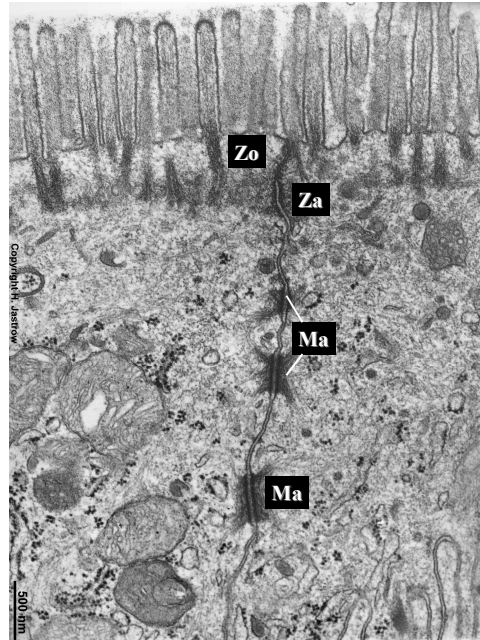


Figure 2 : Cliché de microscopie électronique de deux cellules épithéliales (issu de [EMAtlas 2002]). Les différents types de jonctions cellulaires sont indiqués par les notations Zo : jonction étanche, Za : jonction adhérente, Ma : macula adhaerens ou desmosome. Les desmosomes n'existent pas entre cellules endothéliales.

Les cadhérines sont impliquées dans les jonctions adhérentes via des interactions homotypiques, dépendantes du calcium qui permettent la formation de liaisons homophiliques² entre des cellules de type identique [Takeichi 1991]. Par le biais de ces interactions homotypiques et homophiliques, les cadhérines entraînent l'élaboration des différents types de tissus solides lors par exemple de l'embryogenèse. Les cadhérines portent l'initiale du tissu dans lequel elles ont été mises en évidence pour la première fois ou dans lequel elles sont majoritaires. Par exemple, on note "E-cadhérine" la cadhérine des cellules Epithéliales. Deux cadhérines, la N- et la R-cadhérine (N pour *neural* et R pour *retinal*) font figure d'exception et des interactions hétérotypiques entre ces cadhérines ont été observées [Shapiro 1995, Shan 2000]. Les cadhérines élaborent entre les cellules endothéliales ou épithéliales une ceinture constituée d'assemblages de cadhérines ou *clusters* dont le rôle serait d'augmenter la solidité de la jonction [Shapiro 1995].

Notons que dans l'organisme, le calcium est activement excrété des cellules par des pompes ioniques, stabilisant la concentration intracellulaire en calcium

² Homophilique = mettant en jeu deux cellules du même type. Homotypique = entre deux molécules du même type.

libre aux environs de 100 nM. Chez l'homme, la concentration en calcium dans le sang est de 2,5 mM, dont environ 1,2 mM libre, le reste étant lié à diverses molécules. Les cadhérines interagissent en présence d'une concentration locale de 1 à 2 mM de calcium. Un appauvrissement du milieu en calcium désorganise les jonctions cellulaires [Rothen-Rutishauser 2002].

Les cadhérines n'ont pas seulement une fonction adhérente de cohésion et de maintien des tissus [Steinberg 1999]. Il a été montré qu'elles ont un rôle important dans la signalisation et la reconnaissance entre cellules [Gumbiner 1996]. Un changement de l'expression des cadhérines d'une cellule déclenche un processus de morphorégulation, comme la différenciation des cellules et la formation de tissu. Par exemple, lors de l'embryogenèse, les cellules différenciées sont triées grâce à des interactions impliquant des cadhérines [Vleminckx 1999, Tepass 1999]. A l'opposé, un dysfonctionnement de l'activité des cadhérines peut avoir des conséquences néfastes. Ainsi, la rupture de la jonction entre les cellules peut perturber la différenciation des cellules et l'embryogenèse. Les cadhérines sont connues ainsi pour leur action de suppression de tumeur cancéreuse [Takeichi 1993]. Le processus de cancérisation est initié par la perte d'adhérence de cellules qui peuvent alors se déplacer dans tout l'organisme.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux cadhérines classiques : la C-cadhérine des embryons de grenouille *Xenopus*, appelée aussi EP-cadhérine pour son analogie avec les cadhérines de l'Epithélium et du Placenta, et la VE-cadhérine humaine exprimée dans l'Endothélium Vasculaire. Parmi les cadhérines classiques, on distingue deux classes en fonction de leurs similitudes de séquences en acides aminés, la classe I et la classe II. La C-cadhérine appartient à la classe I et la VE-cadhérine à la classe II. Nous détaillerons plus loin leurs particularités.

II.1.2 Les cadhérines classiques

Les cadhérines classiques sont des protéines transmembranaires constituées de trois régions, comme le montre la Figure 3 [voir, par exemple, Tepass 1999]:

- une partie extracellulaire glycosylée qui est composée de cinq domaines ou modules homologues en chapelet, nommé EC pour *ExtraCellular* [Shapiro 1995]. Ils sont numérotés de 1 à 5 à partir du côté N-terminal, le domaine EC5 étant adjacent à la membrane cellulaire. Ces domaines sont le siège de l'adhérence entre les cadhérines. L'adhérence entre cellules n'est en effet pas perturbée si les cadhérines sont tronquées de leur partie intracellulaire [Ozawa 1998]. Le calcium est nécessaire à la stabilisation de la structure tertiaire de la partie extracellulaire des cadhérines ce qui leur confère une résistance à la protéolyse. La liaison entre deux domaines extracellulaires consécutifs est rigidifiée par la présence de trois ions calcium Ca^{2+} , soit douze ions au total pour la cadhérine.

- une partie transmembranaire hydrophobe.
- une partie cytoplasmique qui est liée à l'actine du cytosquelette par l'intermédiaire de plusieurs protéines cytoplasmiques (notamment les caténines). Cette partie est très conservée parmi les différents types de cadhérine. Elle joue

vraisemblablement un rôle de renfort de la liaison entre les cellules [Behrens 1999].

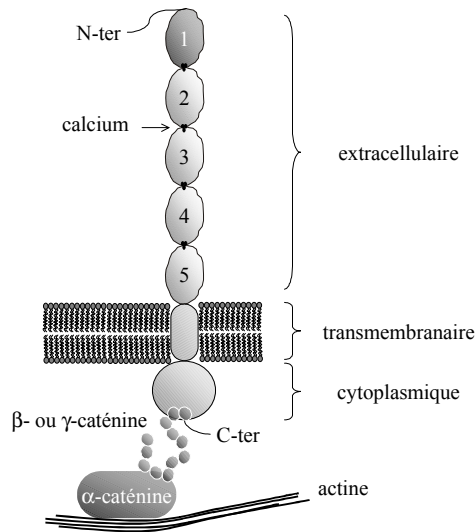


Figure 3 : Schéma d'une cadhérine insérée dans la membrane cellulaire. Trois ions Ca^{2+} sont fixés entre deux domaines extracellulaires consécutifs.

De nombreuses études concernent la partie cytoplasmique des cadhérines et cherchent à établir son implication dans la signalisation intracellulaire ainsi que la nature des interactions mises en jeu avec des protéines du cytoplasme et plus spécifiquement du cytosquelette. Par exemple, des études *in vivo* sur des cultures de cellules possédant des cadhérines mutées³ ou tronquées⁴ ont permis de comprendre le rôle particulier de certains acides aminés dans ces interactions [Behrens 1999]. Il est aussi possible d'étudier le rôle des cadhérines sur le développement embryonnaire en invalidant leur gène chez la souris. Ainsi, S. Gory-Fauré *et al.* ont montré que des embryons de souris n'exprimant pas la VE-cadhérine ne se développent pas correctement et meurent après quelques jours de gestation du fait d'un système vasculaire défectueux [Gory-Fauré 1999].

Parallèlement, pour comprendre précisément le mécanisme des interactions homotypiques régis par les cadhérines, de nombreux auteurs ont choisi de travailler *in vitro* sur des protéines tronquées de leurs parties intracellulaires et transmembranaire. Différents systèmes d'expression⁵ ont été utilisés pour produire des molécules de cadhérine composées d'un ou plusieurs modules extracellulaires. Nous nous sommes intéressés au cours de ce travail de thèse uniquement à la partie extracellulaire des cadhérines.

³ Protéine dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont remplacés par un/des acide(s) aminé(s) différent(s).

⁴ Protéine dans laquelle un grand nombre d'acides aminés ou tout un domaine structural est enlevé.

⁵ Production *in vitro* de protéines à partir de son ADN. La protéine ainsi exprimée est appelée recombinante. La bactérie *E. Coli* est un exemple de système d'expression largement répandu.

II.1.3 Relations structure - fonction des cadhérines

Les détails des interactions existant entre cadhérines sont à ce jour controversés. Pour la biologie structurale, la fonction d'une protéine est reliée à sa structure tridimensionnelle. Nous allons voir qu'il existe en effet une relation étroite entre la fonction adhérente de la partie extracellulaire des cadhérines et sa structure. Nous présenterons les modèles d'interactions actuels, puis nous exposerons les questions auxquelles nous nous sommes intéressés au cours de ce travail de thèse.

II.1.3.1 Formation de dimères de cadhérine

Considérons deux cellules voisines exprimant des cadhérines à leur surface (Figure 4). Pour créer une jonction entre ces cellules, deux cadhérines appartenant aux cellules opposées interagissent, en formation un complexe adhérents.. Ces interactions, aussi nommées "*trans*" ou "antiparallèle", conduiraient à la formation de dimères de cadhérines [Shapiro 1995]. Des interactions latérales entre cadhérines appartenant à la même cellule ont été également mises en évidence, elles sont appelées "*cis*" ou "parallèles". Les complexes *cis* représentent ainsi des interactions entre des cadhérines d'une même cellule et les complexes *trans* des interactions entre cellules opposées dans la jonction. Ainsi, une interaction *trans* pourrait ainsi faire intervenir (1) soit deux cadhérines sous forme monomérique s'associant en un dimère *trans*, (2) soit deux dimères *cis* interagissant de manière antiparallèle en un "tétramère" *trans*.

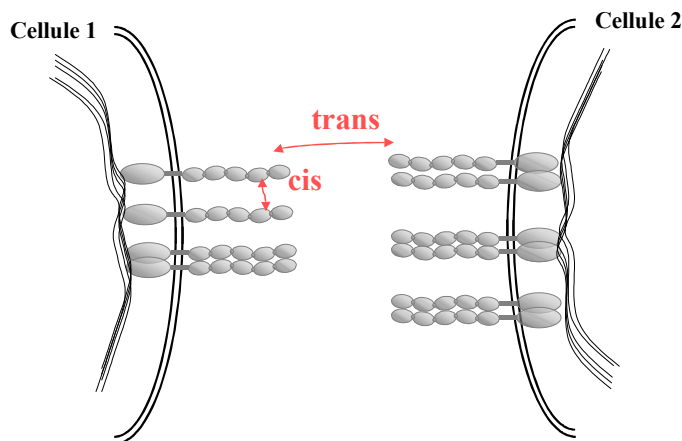


Figure 4 : Représentation des interactions parallèles (*cis*) et anti-parallèles (*trans*) entre les domaines extracellulaires de cadhérines.

Pour un grand nombre d'auteurs, des dimères *cis* seraient la base des interactions adhérentes, comme le souligne D. Leckband dans une revue récente [Leckband 2002]. D'après Renaud-Young *et al.*, les dimères *cis* seraient nécessaires pour engager les interactions adhérentes, puis ils se désassembleraient pour permettre la formation de dimères *trans*, et non de tétramère *trans* [Renaud-Young 2002]. De leur côté, R. Iino *et al.* ont observé, à la surface libre de cellules vivantes (c'est-à-dire en dehors de jonctions adhérentes), la présence d'oligomères de E-cadhérine de différentes tailles, allant du dimère au décamère [Iino

2001]. Pour les auteurs, des dimères pourraient être à l'origine de la formation de ces oligomères.

Les concentrations en calcium nécessaires à la formation de dimères *cis* ou *trans* ont été déterminées par O. Pertz *et al.* [Pertz 1998]. Selon leur étude, les cadhérines ne sont pas repliées correctement lorsque la concentration en calcium environnante est inférieure à 50 μM . Pour des concentrations comprises entre 50 μM et 500 μM d'ions calcium, les cadhérines adoptent leur conformation native. Alors que des interactions *cis* entre protéines parallèles se créent pour des concentrations comprises entre 500 μM et 1 mM , les interactions *trans* se constituent à partir de 1 mM . Ces interactions sont traduites par des affinités entre l'ion calcium et un site de fixation du calcium différentes selon les domaines consécutifs. Les auteurs ont mesuré une constante de dissociation de 30 μM pour les sites de fixation du calcium situés entre les domaines EC5 et EC4, EC4 et EC3 ainsi que EC3 et EC2. Entre les domaines EC2 et EC1, la constante de dissociation est de 330 μM pour deux sites de fixation du calcium et de 2 mM pour le troisième.

II.1.3.2 Rôles des domaines extracellulaires

Une des questions majeures sur le mode d'assemblage des cadhérines concerne le rôle joué par les différents domaines extracellulaires. Le domaine N-terminal EC1 est depuis longtemps identifié comme étant indispensable à la reconnaissance entre cadhérines [Takeichi 1991]. Plus récemment, Renaud-Young *et al.* ont montré que le domaine EC1 est nécessaire aux interactions, mais en se liant à un domaine autre qu'un domaine EC1 d'une cadhérine voisine [Renaud-Young 2002].

Le motif HAV

La comparaison des séquences d'acides aminés des cadhérines a apporté des éléments de réponses quant au mécanisme d'auto-association des cadhérines. Certains acides aminés des cadhérines classiques sont plus ou moins conservés d'une cadhérine à l'autre, ce qui suggère leur implication dans une fonction adhérente ou de spécificité de la cadhérine. Des expériences de mutation ponctuelle permettent de sonder le rôle d'acides aminés supposés intervenir dans l'adhérence, et impliqués en particulier dans la fixation des ions calcium. Le domaine EC1 contient un motif supposé de reconnaissance entre cadhérines, composés de trois acides aminés : histidine, alanine, valine (HAV). Une différence notable de séquence apparaît cependant entre les cadhérines de classe I qui possèdent ce motif et celles de classes II où il est remplacé par le motif QAV (glutamine, alanine, valine) ou QAI (glutamine, alanine, isoleucine), ou encore VIV (valine, isoleucine, valine) dans le cas de la VE-cadhérine. Bien que différents, ces motifs ont été décrits comme essentiels aux interactions entre cadhérines.

La particularité des acides aminés HAV est qu'ils forment une poche hydrophobe au sein du domaine EC1 dans laquelle pourrait se loger un tryptophane (W ou Trp) appartenant soit à la même cadhérine, soit à une cadhérine voisine en interaction parallèle ou anti-parallèle [Shapiro 1995, Nagar 1996]. Mais cette

hypothèse est controversée par Renaud-Young *et al.* [Renaud-Young 2002] et par l'équipe de B. Gumbiner [Boggon 2002] qui ont montré par une étude de mutagenèse dirigée sur ce motif qu'il n'était pas impliqué dans l'interaction entre cadhérines.

Structures cristallographiques de fragments

La cristallographie des fragments recombinants de cadhérines apporte des informations indispensables sur leurs structures qui peuvent permettre d'en déduire des renseignements quant à leurs modes d'assemblage. A ce jour, six groupes de recherche ont obtenu des cristaux de la partie extracellulaire des cadhérines entière ou tronquée et en ont déterminé la structure atomique. En supposant que la structure observée dans le cristal soit représentative de la forme *in vivo* des cadhérines, les auteurs interprètent leurs résultats en formulant des hypothèses sur les interactions entre cadhérines. Toutefois, les interactions observées dans la structure cristallographique peuvent être fortuites car dues à l'arrangement et à la symétrie du cristal. Des précautions sont donc à prendre dans l'interprétation des données et des études complémentaires biochimiques ou cellulaires sont nécessaires pour valider un modèle d'interaction.

Les références des travaux présentant la résolution des structures cristallographiques de fragments de cadhérines sont rassemblées dans le Tableau 1, les figures correspondantes se trouvent en Annexe 2. A partir de la taille des fragments, nous avons calculé la longueur moyenne d'un domaine extracellulaire de cadhérine : 4,7 nm, ce qui implique une longueur totale de la partie extracellulaire de 23,5 nm dans une configuration où les cinq domaines sont alignés.

Cadhérine	Longueur (nm)	Longueur / domaine (nm)	Résolution (nm)	Code PDB	Auteurs	Méthode
<i>1 domaine</i>						
N-cadhérine	4,5	4,5	0,190	1NCG	Shapiro 1995	Diffraction X
E-cadhérine	4,8	4,8	-	1SUH	Overduin 1995	RMN
<i>2 domaines</i>						
N-cadhérine	9,2	4,6	0,340	1NCJ	Tamura 1998	Diffraction X
E-cadhérine	9,6	4,8	0,200	1EDH	Nagar 1996	Diffraction X
E-cadhérine	9,6	4,8	0,293	1FF5	Pertz 1998	Diffraction X
<i>5 domaines</i>						
C-cadhérine	21,0	4,7	0,308	1L3W	[Boggon 2002]	Diffraction X

Tableau 1 : Longueurs de domaines de cadhérines données par les auteurs et mesurées par le logiciel DSViewerPro 5.0 (Preview) (Accelrys Inc).

L'analyse de la séquence des cadhérines suggère la formation d'une structure en "greek key" (voir Annexe 2). Ce motif figure effectivement dans toutes les structures cristallographiques obtenues pour les domaines EC1 et/ou EC2 et dans la structure du fragment extracellulaire entier EC1-5. en revanche, il existe

plusieurs modèles décrivant les interactions entre fragments de cadhérine provenant des structures cristallographiques du domaine EC1 ou du fragment EC1-2.

L. Shapiro *et al.* sont les premiers à avoir proposé un modèle d'interaction basé sur la structure cristallographique du domaine EC1 de N-cadhérine (voir Figure 121, Annexe 2)[Shapiro 1995]. Selon les auteurs, le résidu Trp2 d'un domaine EC1 se loge dans une poche hydrophobe formée dans le domaine EC1 d'une molécule voisine en interaction parallèle. A l'interface entre deux cellules, l'interaction entre plusieurs cadhérines serait effectuée par une interaction *trans* entre ces dimères *cis* conduisant à la formation d'une chaîne de cadhérines, comme indiqué sur la Figure 5a). Ce modèle appelé "zipper model" est très connu car il a été le premier à tenter d'expliquer la force de la liaison entre cellules par une action synergique des cadhérines [Weis 1995]. Il est cependant contredit aujourd'hui car la surface d'interaction entre les deux fragments a été démontrée inactive [Boggon 2002].

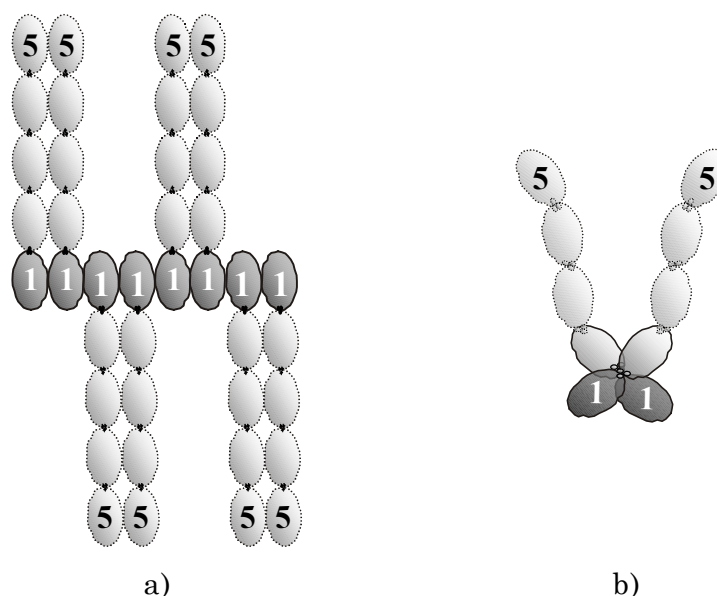


Figure 5 : Représentations schématiques des modèles d'interaction entre fragments extracellulaires de cadhérine : a) modèle de L. Shapiro *et al.* élaboré à partir du fragment EC1 de N-cadhérine; b) modèle élaboré à partir de fragments EC1-2 et correspondant aux descriptions de B. Nagar *et al.*, K. Tamura *et al.*, et O. Pertz *et al.*

B. Nagar *et al.* ont obtenu peu après une structure cristallographique du fragment EC1-2 de E-cadhérine [Nagar1996]. Dans le cristal, les domaines EC1 et EC2 forment un angle d'environ 130° (Figure 5b). Les auteurs ont observé une liaison *cis* entre fragments située près des sites de fixation du calcium, c'est-à-dire dans la région située entre deux domaines consécutifs et ne mettant pas en jeu les résidus Trp2 (voir Figure 123, Annexe 2). Les auteurs n'ont pas observé d'interaction *trans* dans cette structure. Un modèle équivalent a été proposé par K. Tamura *et al.* à partir de la structure cristallographique du fragment EC1-2 de N-cadhérine (voir Figure 122, Annexe 2) [Tamura 1998]. De même, le groupe de J. Engel a proposé un modèle d'interactions *cis* et *trans* mettant en jeu les domaines EC1 et EC2 de fragments extracellulaires de E-cadhérine [Tomschy 1996], [Pertz 1998]. La structure cristallographique du fragment EC1-2 proposée

indique que les interactions entre fragments se font au niveau de la fixation du calcium entre les domaines. Ces auteurs ont de plus observé par microscopie électronique des associations *cis* entre les domaines N-terminaux des fragments EC1-5 de E-cadhérine, en présence d'une concentration en calcium de 0,5 mM. Des associations *trans* ont été observées pour des concentrations en calcium plus élevées à partir de 1 mM et impliquant seulement les domaines EC1 et EC2. (voir la Figure 124, Annexe 2).

Les protéines tronquées ne présentent pas forcément les mêmes interactions que les parties extracellulaires entières de cadhérines. Les structures cristallographiques de fragments courts de cadhérines (moins de cinq domaines) ont constitué jusqu'à aujourd'hui une source riche d'informations, mais elles apportent des informations restreintes sur les interactions. La structure du fragment extracellulaire entier de C-cadhérine, obtenue récemment par l'équipe de B. Gumbiner, est par conséquent très intéressante puisqu'elle contient l'ensemble des domaines extracellulaires [Boggon 2002].

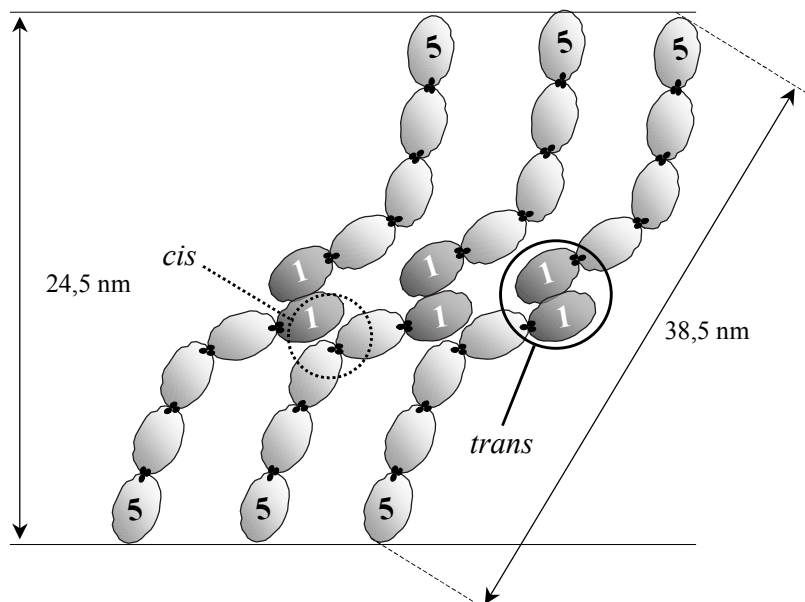


Figure 6 : Modèle d'interactions *cis* et *trans* d'après les observations de la structure cristallographique du fragment EC1-5 de C-cadhérine [Boggon 2002]. Du fait de la projection de la structure tridimensionnelle, les interactions *cis* n'apparaissent que sur les fragments inférieurs.

D'après la structure cristallographique, la C-cadhérine est allongée et courbée en forme d'arc, le domaine EC1 se trouvant presque perpendiculaire au domaine EC5. Une courbure du même type avait été déjà observée par O. Pertz *et al.* [Pertz 1998]. Les auteurs ont observé des assemblages *cis* et *trans* de fragments extracellulaires de C-cadhérine dans la structure cristallographique. Des interactions *cis* se formeraient entre un domaine EC1 et la partie concave à l'interface entre les domaines EC2 et EC3. Des interactions *trans* se feraient par l'échange du résidu Trp2 entre deux domaines EC1 appartenant à deux cadhérines de cellules opposées. Un tel complexe de deux fragments de C-cadhérine antiparallèles mesure 38,5 nm. Enfin, les auteurs proposent un modèle d'organisation des cadhérines en réseau à l'interface entre deux cellules, comme indiqué sur la Figure 6. Dans ce modèle d'interaction, les complexes *trans* de fragments

de cadhérine seraient inclinés de 40° par rapport à la surface de la cellule et la distance inter-cellule correspondante serait de 24,5 nm.

Auto-association de fragments

Des expériences menées sur des mutants de cadhérine possédant un nombre restreint de domaines ont précisé les rôles de chaque module dans l'adhérence. Par exemple, dans une étude des interactions entre fragments de C-cadhérine, S. Chappuis-Flament *et al.* ont montré par centrifugation analytique que les fragments constitués des domaines EC1 ou EC 2 seuls, ainsi que le fragment EC1-2 s'auto-associent faiblement [Chappuis-Flament 2001]. Une adhérence plus importante a été mise en évidence pour les fragments composés au minimum des trois domaines EC1, EC2 et EC3. Les auteurs remarquent toutefois que le domaine EC3 n'est pas indispensable pour l'adhérence puisque les fragments EC1-2-4 ainsi que les fragments EC1-2-4-5 s'auto-associent. Les auteurs ne mentionnent pas d'interactions mixtes, c'est-à-dire entre fragments non identiques.

Le groupe de D. Gulino a montré que la VE-cadhérine peut s'auto-assembler en dimères ou en hexamères selon le nombre de domaines extracellulaires du fragment [Legrand 2001, Bibert 2002]. Les domaines EC1 et EC4 seuls, ainsi que les fragments EC1-2 et EC1-3 restent sous forme monomérique (Figure 7). Les fragments EC3-4 et EC2-4 s'associent en dimères. L'ajout du domaine EC1 pour former le fragment EC1-4 conduit à la formation d'un hexamère. Les fragments EC1-5 s'assemblent également en hexamères. Ainsi, les domaines EC4 et EC1 semblent nécessaires à la formation de l'hexamère.

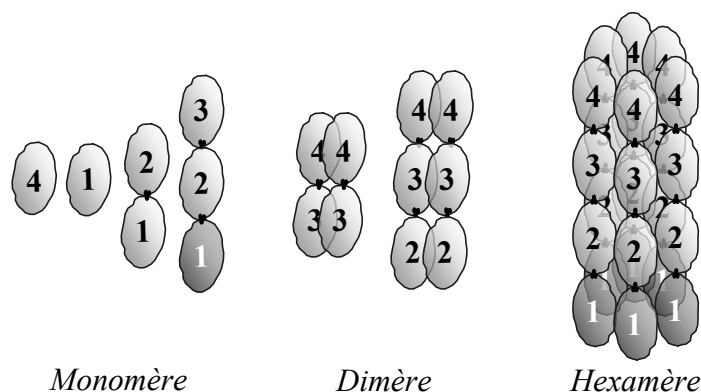


Figure 7 : Représentation schématique des assemblages mis en évidence par S. Bibert *et al.* [Bibert 2002]. Les fragments sont représentés arbitrairement parallèles les uns aux autres.

Les assemblages hexamériques ont été mis en évidence par plusieurs techniques expérimentales. Le poids moléculaire du complexe a été évalué à six fois le poids du fragment VE-EC1-4His seul par chromatographie par gel filtration et ultracentrifugation analytique. Par microscopie électronique, des assemblages longitudinaux de $23,3 \pm 1$ nm \times $7,7 \pm 0,7$ nm ont été observés. Compte tenu de la taille d'un domaine (4,5 nm), la longueur de l'assemblage correspond à cinq domaines alignés. Les auteurs ont exposé des modèles d'interaction entre les fragments de VE-cadhérine où les molécules sont têtes-bêches et forment un petit canal, comme le montre la Figure 8. Ainsi, l'hexamères serait un arrangement de cadhérines anti-parallèles, c'est-à-dire appartenant à deux cellules adjacentes.

Les modèles présentés permettent d'expliquer que la taille de l'hexamère est égale à la longueur de cinq domaines alignés alors que le fragment étudié n'en comporte que quatre. Selon un premier modèle [Legrand 2001], les domaines des cadhérines antiparallèles sont décalés : les interactions se font au niveau des domaines EC1 et EC3 et des domaines EC2 entre eux (Figure 8a). Un deuxième modèle plus récent [Bibert 2002] propose un alignement non décalé des fragments de VE-cadhérine où les domaines EC3 se font face et les domaines EC2 et EC4 interagissent. Ce second modèle est supporté par le rôle déterminant du domaine EC4 et le fait que les fragments composés des domaines EC1-3 ne forment pas de complexes en solution. Sans pouvoir à l'heure actuelle trancher entre ces deux modèles, les auteurs supposent que la formation d'hexamères à l'interface entre deux cellules permet de renforcer l'adhérence entre les cellules. De plus, les hexamères pourraient se rassembler en réseau mettant en jeu des interactions parallèles entre cadhérines appartenant à des hexamères distincts.

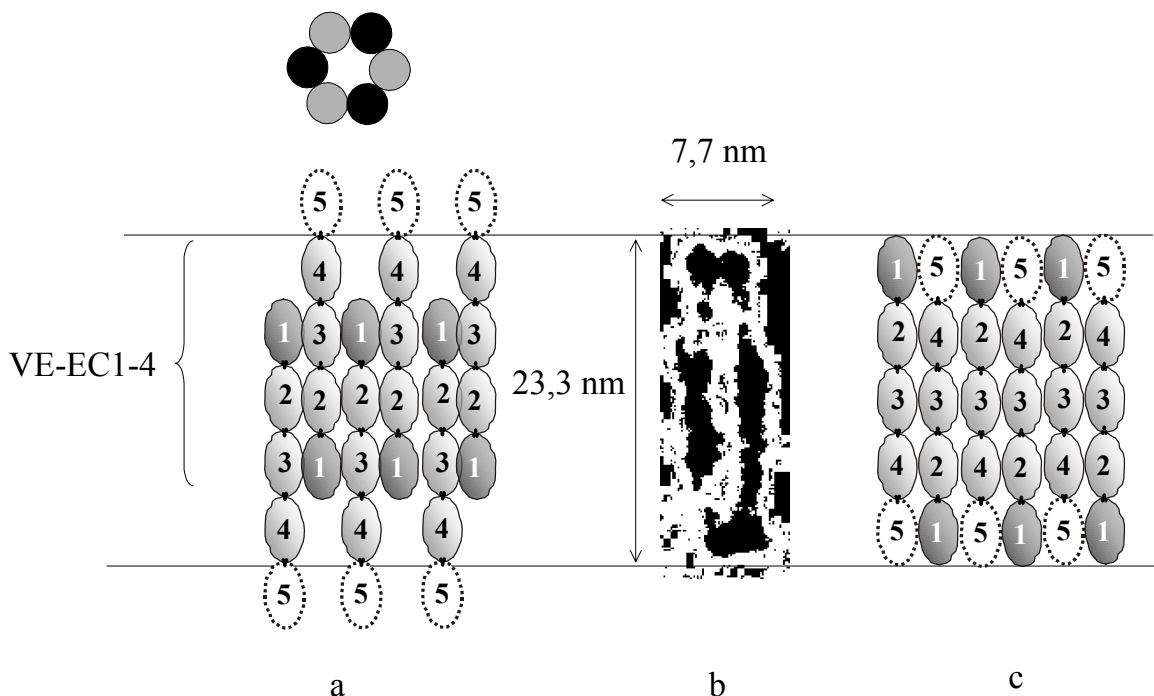


Figure 8 : a) Modèle d'association des fragments VE-EC1-4 en hexamères. En haut : vue de dessus de l'hexamère indiquant la formation en canal. En bas : vue de côté de l'hexamère indiquant l'alignement des domaines EC1-EC3 et EC2-EC2. b) Cliché de microscopie électronique à transmission d'un hexamère [Legrand 2001].

Une technique puissante : la mesure de force de surface

D. Leckband *et al.* [Leckband 2000, Sivasankar 2001a] ont montré par des mesures de force de surface qu'il existe trois types d'association anti-parallèle entre cadhérines. Dans un premier type d'association, les C-cadhérines interagissent sur toute leur longueur, en étant totalement enchevêtrées (en anglais, "*totally interdigitated*"), c'est-à-dire que le domaine EC1 interagit avec le domaine EC5, le domaine EC2 avec domaine EC4, et les domaines EC3 entre eux (Figure 9, a). Dans un deuxième type d'association, elles interagissent en formant un complexe décalé d'environ 1,5 domaines par rapport au premier type, permettant

les interactions entre les domaines EC1 et EC4, et EC2 et EC3 (Figure 9, b). Enfin dans un troisième type d'association, seuls les domaines EC1 et EC2 interagissent (Figure 9, c). Ainsi, un seul type d'association implique une adhérence entre domaines EC1 et/ou EC2. Les auteurs postulent que les cadhérines forment préalablement des dimères *cis* mais cela n'est pas démontré par ces résultats.

Note sur le rôle de la glycosylation

Quinze sites de glycosylation ont pu être mis en évidence dans la structure du fragment EC1-5 de C-cadhérine [Boggon 2002]. Ces sites se trouvent en majorité répartis sur les domaines 3 et 4, deux sont situés sur les domaines 2 et 5. Geyer *et al.* ont analysé les sites de glycosylation de la VE-cadhérine. En particulier, les auteurs ont mis en évidence une relation entre l'appauvrissement en ions Ca^{2+} de la culture de cellules endothéliales et la disparition de la VE-cadhérine et des polysaccharides aux jonctions cellulaires. [Geyer 1999]. Selon les auteurs, les polysaccharides pourraient jouer un rôle dans l'organisation des VE-cadhérines aux jonctions adhérentes. Il est donc probable que les chaînes polysaccharidiques jouent un rôle dans la reconnaissance entre cadhérines, mais cela n'est pas compris actuellement.

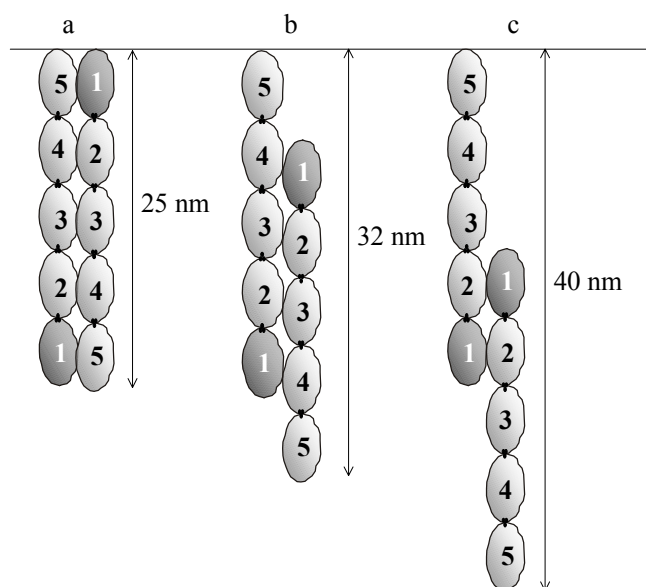


Figure 9 : Trois alignements de C-cadhérines anti-parallèles proposés pour décrire les résultats de mesure de force de surface par S.Sivasankar *et al.* [Sivasankar2001b].

Conclusion

Il semble aujourd'hui acquis que la formation de complexes parallèles est nécessaire à la reconnaissance inter-cellulaire. Pour la plupart des fragments extracellulaires de cadhérine étudiés, ces complexes seraient des dimères, mis à part le cas de la partie extracellulaire de VE-cadhérine qui s'assemblerait en hexamère. Le résidu Trp2 semble se loger dans une poche hydrophobe pouvant appartenir à une cadhérine en position aussi bien *cis* que *trans*. La longueur de la partie extracellulaire des cadhérines est d'environ 23,5 nm si les modules sont alignés. Si les cadhérines sont disposées à la surface des cellules en étant tota-

lement enchevêtrées, cette longueur représente la distance entre deux cellules. Mais les cadhérines ne sont pas rigides *in vivo*, et les interactions entre les parties extracellulaires impliquent des distances inter-cellules variables. Les domaines N-terminaux, en particulier le domaine EC1, jouent donc un rôle très important dans le mécanisme d'interaction en fragment de cadhérine, mais ce rôle n'est pas encore parfaitement compris.

Dans un commentaire relatif à la publication de la structure de la partie extracellulaire entière de C-cadhérine, D. Leckband résume les questions demeurant en [Leckband2002]. Elles concernent les rôles respectifs des modules extracellulaires dans les complexes, en particulier celui du module EC1, et le mécanisme d'interaction entre les dimères *cis* et *trans*.

II.1.3.3 Résumé de la problématique

Des études biochimiques ont permis de comprendre une partie des activités de signalisation des cadhérines dans l'organisme, leur organisation aux jonctions cellulaires et les interactions avec des molécules cytoplasmiques. Toutefois, le mécanisme moléculaire régissant les interactions entre les domaines extracellulaires des cadhérines n'est pas encore bien compris. Le regroupement des cadhérines à la surface des cellules semble important. L'influence du cytosquelette d'actine sur ce regroupement reste mal définie [Gumbiner 2000]. Une meilleure connaissance structurale des cadhérines permettrait d'en mieux comprendre les dysfonctionnements et dans un futur plus lointain, la conception de molécules à visées thérapeutiques.

Les recherches actuelles se penchent sur les rôles des cadhérines au-delà de l'adhérence cellulaire et notamment sur leurs liaisons avec l'actine et avec d'autres protéines extra- ou intracellulaires, ainsi qu'aux mécanismes moléculaires aboutissant aux interactions entre cadhérines. Plus précisément, on cherche à déterminer la nature des domaines extracellulaires et des acides aminés impliqués dans les interactions *cis* ou *trans* entre fragments extracellulaires de cadhérine. Dans ce travail, à travers l'étude de deux fragments de cadhérines différentes, nous avons cherché à mettre en évidence l'existence d'interactions *cis* ou *trans* d'une manière dépendante de la concentration en calcium environnant et à préciser les domaines intervenant dans ces interactions.

II.1.4 Les cadhérines étudiées

II.1.4.1 C-cadhérine

La C-cadhérine a été mentionnée pour la première fois par Ginsberg *et al.* [Ginsberg 1991]. Elle est exprimée chez la grenouille *Xenopus*. Elle a été d'abord nommée EP-cadhérine en raison de sa ressemblance par homologie de séquence avec les cadhérines E (épithélium) et P (placenta). Elle sert de cadhérine modèle aux travaux de trois équipes américaines sur les mesures de force entre cadhérines [Leckband 2001], sur l'association entre domaines extracellulaires [Chappuis-Flament 2001] et sur la structure cristallographique [Boggon 2002]. Notre travail a fait l'objet d'une collaboration étroite avec le Pr. Deborah Leck-

band et son équipe du Departement of Chemical Engineering de l'Université d'Illinois à Urbana-Champaign (U.I.U.C.) aux Etats-Unis. En particulier, une partie des expériences présentées a été réalisée avec Sanjeevi Sivasankar et de premières interprétations ont été discutées dans sa thèse [Sivasankar 2001a].

La production et la purification des fragments de C-cadhérine ont été effectuées par S. Sivasankar puis I. Jensen du laboratoire de D. Leckband. Le fragment principal que nous avons utilisé est constitué de la région extracellulaire de C-cadhérine possédant une étiquette polyhistidine à son extrémité C-terminale. L'étiquette polyhistidine est insérée en bout de la chaîne d'acides aminés afin de pouvoir purifier la protéine recombinante sur une colonne chargée en ions Ni^{2+} . Nous utiliserons cette propriété pour l'immobilisation des fragments sur surface solide ou à l'interface air-eau. Le poids moléculaire du fragment a été évalué à environ 70 kDa [Chappuis-Flament 2001]. Par la suite, nous appellerons cette protéine C-EC1-5His. La surexpression des fragments de C-cadhérine est faite dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) qui accomplissent la glycosylation de la protéine. Les étapes principales de la purification des fragments de C-cadhérine ont été décrites dans la thèse mentionnée plus haut [Sivasankar 2001a]. La protéine est produite et conservée dans un tampon Tris-HCl (50 mM), NaCl (100mM) à pH 7,5. la concentration en calcium (CaCl_2) est de 2mM pendant la purification. Par la suite, cette concentration peut être ajustée de 0 à 5 mM.

S. Chappuis-Flament *et al.* ont étudié l'association de fragments de C-cadhérine en solution par analyse de l'équilibre de sédimentation [ChappuisFlament2001]. Des solutions contenant des fragments de C-cadhérine en concentrations variables sont analysées pour déterminer les pourcentages de dimères et de monomères. Les auteurs en déduisent un modèle d'association qui permet d'extrapoler les pourcentages de monomères et de dimères pour toute concentration comme l'indique la Figure 10. La solution contient autant de monomères que de dimères à une concentration de 64 μM de fragments de C-cadhérine. Dans ce travail, nous avons utilisé des solutions de fragments de C-cadhérine ayant des concentrations initiales équivalentes à une fraction de 40% à 50% de dimères.

Nous avons également utilisés des fragments plus courts de C-cadhérine produits par l'équipe de B. Gumbiner de l'Université de Virginie aux Etats-Unis [ChappuisFlament2001]. Ces protéines sont constituées de deux à quatre domaines extracellulaires de C-cadhérine liés à un domaine Fc des immunoglobulines. Elles ne comportent pas d'étiquette polyhistidine. Ces chimères seront dénommées Fc-C-EC suivi de deux chiffres correspondant aux domaines présents. Par exemple, le fragment Fc-C-EC1-3 est composée des domaine EC1, EC2 et EC3 et Fc. Ces fragments forment des dimères orientés de manière parallèle grâce à la liaison entre les domaines Fc par pont disulfure. D'après les auteurs, les cadhérines interagissant sous forme de dimères, cette dimérisation *cis* forcée devraient favoriser les interactions *trans* entre fragments courts et permettre de simuler en quelque sorte une jonction entre deux cellules [ChappuisFlament2001]. Les auteurs ont ainsi pu étudier les affinités entre fragments et chercher les domaines nécessaires à l'interaction entre cadhérines, comme nous l'avons décrit plus

haut (p. 13). Les fragments de C-cadhérine sont utilisés sans purification supplémentaire et conservés dans un tampon identique à celui du fragment C-EC1-5His contenant 2 mM de CaCl_2 , à 4°C.

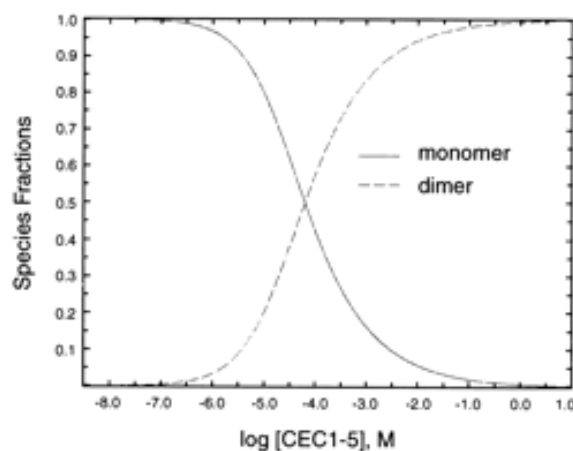


Figure 10 : Equilibre entre dimères et monomères de C-cadhérines. Figure tirée de la référence [ChappuisFlament2001].

II.1.4.2 VE-cadhérine

Cette partie de notre étude a été effectuée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Danielle Gulino du laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (programme Physique et Chimie du Vivant du CNRS). Les travaux concernant les fragments extracellulaires de VE-cadhérine humaine impliquent deux autres étudiantes au cours de leur thèse, Stéphanie Bibert et Rana Al-Kurdi.

Des fragments recombinants recouvrant un nombre varié de modules extracellulaires de VE-cadhérine sont capables de s'auto-assembler (voir la Figure 7). Certains des fragments à deux ou trois modules s'associent sous forme de dimères et les fragments à quatre et cinq modules sous forme d'hexamères [Bibert 2002, Legrand 2001].

La surexpression des fragments de VE-cadhérine que nous avons utilisés est faite dans *E. Coli*. La production de la protéine dans la bactérie rend difficile l'expression du domaine EC5 qui contient quatre cystéines susceptibles de former des ponts disulfures. Le principal fragment est donc constitué des domaines EC1 à EC4 et possède une étiquette polyhistidine en position C-terminale. Ce fragment est appelé VE-EC1-4His. D'autres fragments plus courts sont exprimés de la même façon mais ne possèdent pas d'étiquette histidine. Nous avons utilisé les fragments VE-EC1-3, VE-EC3-4 et VE-EC2-4. La VE-cadhérine est purifiée dans un tampon Tris (40 mM), à pH 8, contenant 100 mM NaCl et 5 mM CaCl_2 .

Comme pour la C-cadhérine, l'association des fragments de VE-cadhérine a été analysée afin de connaître le pourcentage de fragments sous formes monomérique et hexamérique à une concentration donnée. Une solution de concentration en fragments de VE-cadhérine égale à 1 μM contient autant de monomères que d'hexamères [Legrand 2001]. Les solutions de fragments de VE-cadhérine que nous avons utilisées contiennent entre 50% et 80% d'hexamères.

La Figure 11 présente de manière schématique les fragments utilisés au cours de ce travail de thèse. Les caractérisations biologiques et biochimiques de ces protéines ont été effectuées régulièrement pour les fragments de C-cadhérine à l'U.I.U.C. par S. Sivasankar et I. Jensen, et pour les fragments de VE-cadhérine à l'I.B.S. par R. Al-Kurdi, S. Bibert et E. Concord. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante.

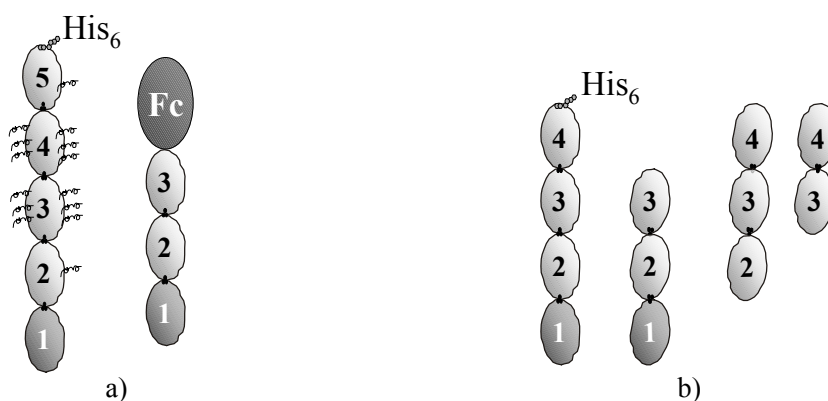


Figure 11 : Fragments utilisés dans cette étude. a) Fragments de C-cadhérine. A gauche, le fragment C-EC1-5His avec indiqués schématiquement les polysaccharides. A droite, un exemple de fragment de C-cadhérine lié à un domaine FC, le fragment Fc-C-EC1-4. b) Fragments de VE-cadhérine. A gauche, le fragment VE-EC1-4His. A droite, les trois fragments étudiés VE-EC1-3, VE-EC2-4 et VE-EC3-4.

II.2 Monocouches de protéines

Pour étudier les interactions entre des molécules d'adhérence, il nous a semblé nécessaire d'utiliser des techniques expérimentales permettant :

- (1) de conserver la protéine dans un état actif;
- (2) que la protéine soit accessible pour interagir avec d'autres molécules;
- (3) de mimer une paroi cellulaire en orientant les parties extracellulaires de cadhérine comme si elles étaient ancrées à une membrane;
- (4) que les techniques d'études puissent mettre en évidence des changements de densité et/ou d'épaisseur de la couche de protéine.

L'immobilisation des fragments extracellulaires de cadhérines sur une surface permet de remplir les trois premières conditions. La surface sur laquelle sont immobilisées les cadhérines peut-être l'eau ou une surface solide. L'intérêt principal de l'immobilisation est de préserver la protéine dans une solution tampon qui lui permet de conserver son activité biochimique et d'orienter les protéines par rapport à la surface. C. Dietrich *et al.* ont montré que la fonction de la protéine n'était pas affecté par l'immobilisation [Dietrich 1996]. Des molécules d'intérêt comme d'autres fragments de cadhérines ou des ions Ca^{2+} peuvent être injectées dans la solution et interagir avec la protéine immobilisée. Ce système ne forme toutefois pas une réplique fidèle de cellule puisqu'il manque la partie cytoplasmique des cadhérines et la cellule opposée, mais il a été utilisé pour mimer une membrane cellulaire et les interactions avec d'autres protéines [Barklis 1998, Konovalov 2002].

Des techniques d'analyse des surfaces traditionnellement employées pour caractériser les couches minces déposées sur une surface solide peuvent être utilisées pour obtenir des informations sur les couches de protéines déposées à l'interface air-eau ou sur surface solide. Le microscope à angle de Brewster (BAM) permet d'obtenir une image de la surface de l'eau avec une résolution micrométrique [Meunier 2000]. Le microscope à force atomique (AFM) permet d'étudier la structure de la surface d'une monocouche ancrées sur une surface solide avec une résolution inférieure au nanomètre [Scheuring 2002]. L'appareil de force surface (SFA) permet de mesurer les forces d'interaction entre deux monocouches de protéines ancrées sur surfaces solides [Leckband 1995]. Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser l'ellipsométrie et la réflectivité des rayons X pour étudier les monocouches de protéines à l'interface air-eau, et la résonance des plasmons de surface pour étudier des monocouches greffées sur surface solide. Ces techniques expérimentales ainsi les méthodes d'analyse développées seront présentées dans le Chapitre I.

II.2.1 Elaboration d'une monocouche de protéines

Des méthodes de formation de monocouches de protéines se sont développées autant à la surface l'eau que sur surfaces solides. Leur principe commun est de disposer sur une surface une molécule reconnue spécifiquement par la protéine et appelée "ligand". Seule cette protéine se fixe sur la surface et l'encombrement stérique et la disposition des ligands en surface fait que le dépôt des protéines s'arrête à la monocouche (voir la Figure 12). Les couches ainsi formées peuvent être amorphes ou cristallisées à deux dimensions. C'est par cette technique que E. Uzgiris et R. Kornberg ont formé des assemblages cristallins bidimensionnels et déterminé les premières structure de monocouches de protéines par microscopie électronique [Uzgiris 1983]. Des techniques de caractérisation et d'étude des surfaces apportent différents types d'information sur la monocouche selon son organisation cristalline ou non.

Il existe un grand nombre de ligands qui peuvent être employer pour former une monocouche de protéines. L'utilisation de lipides fonctionnalisés pour être reconnus par la protéine est très courante. Le principal avantage des lipides est qu'ils forment spontanément une monocouche à l'interface air-eau du fait de leur dualité hydrophile et hydrophobe. La fonctionnalisation des lipides est effectuée par greffage sur la tête polaire d'une entité chimique pouvant interagir avec la protéine, le plus souvent au bout d'un bras espaceur hydrophile. Les lipides les plus utilisés sont ceux fonctionnalisés par un groupement nitrilotriacétate (NTA) chélatant un ion Ni^{2+} qui pourra interagir avec une histidine de la protéine [Kubalek 1994, Dietrich 1995, Vénien-Bryan 1997]. La série d'histidines greffées à certaines protéines recombinantes pour les purifier, appelée étiquette polyhistidine (en anglais, *his-tag*) est parfaitement adaptée. Au cours de ce travail de thèse, nous avons essentiellement étudié des protéines avec étiquette histidine. Nous avons fait un essai non concluant avec des lipides maléimides pouvant former un pont disulfure avec une cystéine de surface d'un fragment de VE-cadhérine. La forte affinité du couple avidine-biotine peut aussi être utilisée en

fixant une molécule de biotine sur la tête polaire des lipides et une avidine ou une streptavidine sur la protéine d'intérêt.

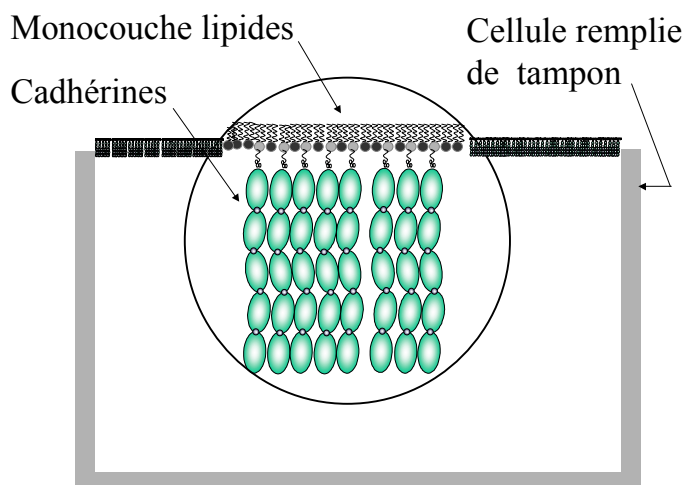


Figure 12 : Monocouche de protéines ancrées à une monocouche de lipides à la surface de l'eau.

Les protéines injectées sous la monocouche lipidique s'adsorbent aux lipides pour former spontanément une monocouche, comme indiqué sur la Figure 12. Nous avons utilisé cette méthode pour élaborer les monocouches de cadhérines. La monocouche lipidique peut alors être transférée sur une surface hydrophobe, par la technique de Langmuir-Blodgett par exemple. Cette technique consiste simplement à immerger lentement le substrat hydrophobe dans la sous-phase, en le conservant perpendiculaire à la surface d'eau recouverte de lipides et tout en maintenant la pression de surface constante par un mouvement de la barrière de la cuve de Langmuir. Une monocouche de lipides se dépose sur le substrat. Ce dernier est ensuite maintenu dans une cellule remplie de solution tampon et une monocouche de protéines peut être élaborée comme à l'interface air-eau. La surface peut être rendue hydrophobe par différentes techniques selon le matériau qui le constitue. Une technique que nous avons utilisée (voir chapitre V) consiste à déposer sur un substrat de verre une couche mince d'or sur laquelle est ensuite déposée une monocouche d'alcane-thiol susceptible de former une liaison covalente entre les atomes d'or et de soufre. Le substrat de verre ne présente généralement pas une planéité assez grande. Une surface de mica peut être employée lorsqu'une surface parfaitement plane est nécessaire. Cette technique est employée par exemple pour les mesures de force de surface [Leckband 1995, Peanasky 1995]. Dans ce cas, la surface de mica, hydrophile, est placée dans la solution tampon préalablement à la formation de la monocouche lipidique à la surface de l'eau. Des lipides non fonctionnalisés sont déposés sur le substrat hydrophile en retirant lentement le substrat perpendiculairement à la surface de l'eau. Cette couche de lipides constitue une surface hydrophobe sur laquelle les lipides fonctionnalisés sont déposés dans un deuxième temps par la technique présentée ci-dessus.

Les monocouches de protéines déposées sur une surface solide présentent plusieurs avantages sur les monocouches élaborées à la surface de l'eau. L'étude

sera globalement facilitée par une moindre fragilité des échantillons et la surface d'étude peut être facilement réduite. Certaines expériences (comme la réflectivité des rayons X) sont facilitées puisque le support peut être incliné. L'inconvénient principal est la rugosité des surfaces. T. Calvert *et al.* ont étudié le rôle des surfaces et de leur qualité sur la formation des cristaux bidimensionnels [Calvert 1997]. Les auteurs ont montré que la rugosité de la surface sur laquelle croît le cristal bi-dimensionnel nuit à la formation du cristal en réduisant le nombre d'interactions entre les protéines et en augmentant la fraction de lipides immobiles, ce qui a pour effet de limiter la réorganisation et la cristallisation des protéines liées aux lipides. La surface de mica clivé présente l'avantage d'une rugosité très faible qui peut égaler la qualité de la surface de l'eau [Calvert 1997, Reiter 1993].

Nous ne nous sommes pas directement intéressés dans ce travail de thèse à la cristallisation des cadhérines à la surface de l'eau. Au contraire, nous avons élaboré des monocouches amorphes de cadhérines afin que les protéines soient libres d'interagir entre elles et que les contacts entre elles ne soient pas uniquement dus à l'ordre cristallin. De plus, nous avons cherché à étudier les interactions entre des cadhérines appartenant à la monocouche et d'autres cadhérines en solution. Or, la compacité des cristaux bidimensionnels est supposée empêcher la diffusion de ces molécules et limiter les interactions entre cadhérines. La cristallisation bidimensionnelle de fragments de VE-cadhérine fait l'objet du travail de thèse de R. Al-Kurdi qui étudie leur structure par microscopie électronique.

II.2.2 Lipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles : ils possèdent deux chaînes aliphatiques hydrophobes qui peuvent être saturées ou insaturées, et une tête polaire hydrophile contenant un groupement phosphate. Les lipides que nous avons utilisés sont synthétiques, mais font partie des lipides présents dans l'organisme dans les réserves lipidiques ou les membranes [Alberts 1994].

Les lipides peuvent être partagés en deux catégories : les ligands qui possèdent à leur tête polaire un groupement supplémentaire capable de lier une molécule et les autres, appelés ci-dessous diluants. Ces derniers peuvent être utiles pour abaisser le nombre de protéines liées à la monocouche de lipides et leur permettre de se réarranger en faisant une couche de protéines moins dense [Calvert 1997, Courty 2001]. Des lipides à chaîne courte, insaturée ou branchée peuvent être utilisés pour rendre fluide une couche de lipides ligands qui ne le serait pas suffisamment [Courty 2002].

Des amphiphiles déposés à la surface de l'eau forment spontanément une monocouche car la tension de surface des amphiphiles est inférieure à celle de l'eau. La pression de surface π est définie par $\pi = \gamma - \gamma_0$ où $\gamma_0 = 72,3$ mN/m est la tension de surface de l'eau et γ celle de l'eau recouverte de la monocouche. La mesure de la pression de surface se fait par une balance de Wilhelmy, la force mesurée étant proportionnelle à la tension de surface. Une isotherme de compression est une mesure à température constante de la pression de surface en fonction de l'aire

occupée par un lipide. Elle permet de mettre en évidence des changements de phase de la couche de lipides. L'isotherme de compression de lipides Ni-NTA-DLGE (Figure 13) montre que ces lipides restent en phase fluide tout au long de la compression. Juste avant de "s'effondrer" c'est-à-dire de former des agrégats en surface ("collapse" de la monocouche) à une pression de surface de 30,7 mN/m, les lipides Ni-NTA-DLGE occupent une aire de 40,1 Å²/lipide. Cela correspond à une masse surfacique de lipides de 3,5 mg/m² ⁽⁶⁾, en utilisant la masse molaire du lipide 849,14 g/mol (voir Tableau 2).

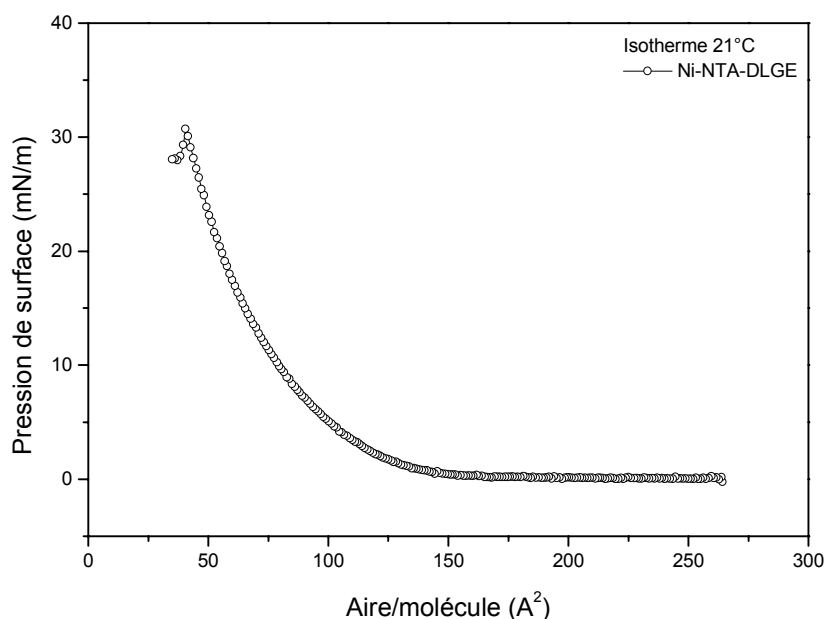


Figure 13 : Isotherme de compression à 21°C des lipides Ni-NTA-DLGE.

Les lipides sont dilués dans du chloroforme. Lors du dépôt, la solution s'étale à la surface de l'eau et le chloroforme s'évapore laissant les lipides former une monocouche à l'interface air-eau. Pour élaborer nos échantillons, nous avons déposé les lipides selon deux protocoles, avec mesure de la pression de surface ou non. Ces méthodes ont été utilisées par P.-F. Lenne *et al.* pour réaliser des cristaux bidimensionnels de protéines [Lenne 1998, Berge 1998]. Dans les deux cas, le dépôt des lipides est effectué jusqu'à obtenir la saturation de la couche. Pratiquement, la saturation est atteinte lorsqu'une goutte de solution lipidique reste plusieurs secondes à la surface de l'eau. Selon les auteurs, à ce moment, les lipides couvrent totalement la surface de l'eau et une goutte supplémentaire constitue un réservoir de lipides agissant par la suite pour maintenir la pression de surface et "réparer" la monocouche en cas de besoin (par exemple, lorsque la couche est percée pour l'injection des protéines ou si des lipides sont endommagés par les rayons X et/ou se solubilisent en formant des micelles). La tension de surface d'un tel système est réputée constante tant que la goutte réservoir joue son rôle [Rieu 1995].

⁶ Les mg/m² sont couramment utilisés pour la comparaison des densités surfacique de masse adsorbée à l'interface air-eau.

II.2.2.1 Lipides diluants

Les lipides diluants utilisés dans ce travail sont des phospholipides composés de deux chaînes identiques. Les chaînes aliphatiques du lipide DTPC sont composées de l'acide gras tridécanoïque (soit 13 carbones à liaisons saturées), Figure 14 a). Les chaînes aliphatiques des lipides DOPC, DOPE et DOPS sont constituées par l'acide gras 9-*cis*-octadécanoïque (soit 18 carbones et une insaturation *cis*), respectivement Figure 14 b), c) et d).

Les lipides diluants proviennent de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, USA). Ils sont utilisés sans purification supplémentaire.

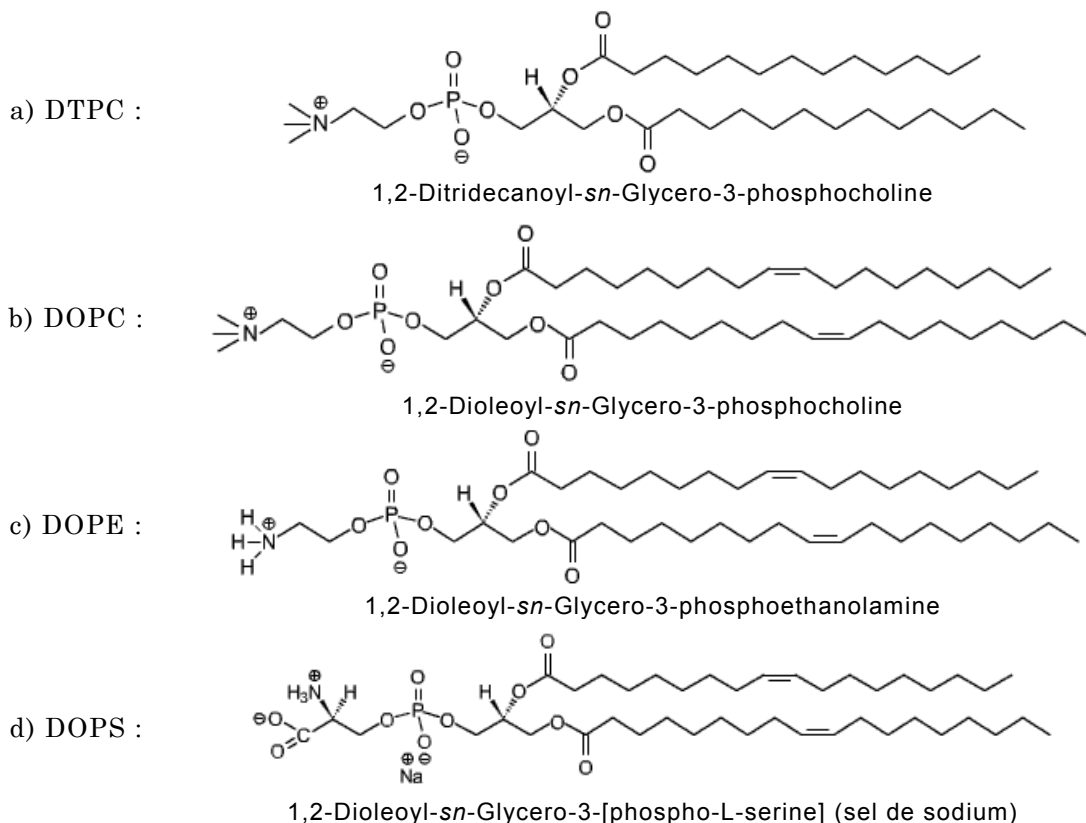
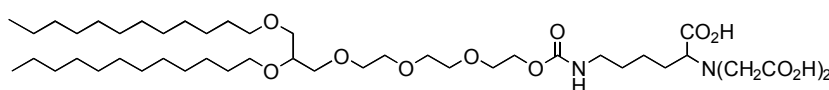


Figure 14 : Structures des lipides diluants utilisés dans ce travail a) DTPC, b) DOPC, c) DOPE et d) DOPS (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA).

II.2.2.2 Lipides ligands

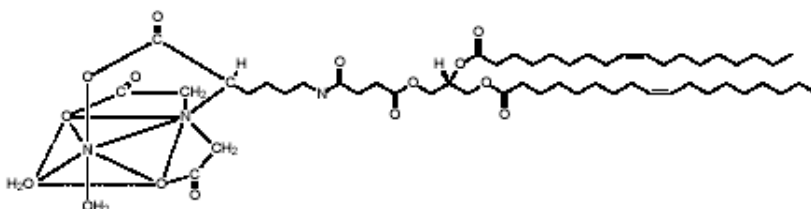
Les deux lipides ligands que nous avons utilisés possèdent un groupement NTA qui chélate un ion Ni^{2+} séparé de la tête polaire par un bras espaceur hydrophile. L'ion Ni^{2+} est lié au groupement NTA par quatre liaisons de coordination [Schmitt 1994]. Les deux sites de coordination libres de l'ion Ni^{2+} sont susceptibles d'être occupés par un donneur d'électron, par exemple l'imidazole d'une histidine. Le lipide Ni-NTA-DLGE (Figure 15) possède un bras espaceur plus court que le lipide Ni-NTA-DOGS (Figure 16). La longueur du bras espaceur est un paramètre important pour la mobilité de la protéine au sein de la monocouche. Par exemple, un bras espaceur long est plus flexible et permet aux protéines de s'orienter dans la monocouche. Il pourra ainsi favoriser la formation de cristaux bidimensionnels de protéine.

Les lipides Ni-NTA-DLGE proviennent de Northern Lipids (Vancouver, Canada), et les lipides Ni-NTA-DOGS de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, USA). Ils sont utilisés sans purification supplémentaire. Le lipide Ni-NTA-DLGE est un lipide dont la chaîne aliphatique est formée à partir de deux acides gras saturés identiques, l'acide dodécanoïque. Le lipide Ni-NTA-DOGS possède deux chaînes aliphatiques identiques composées de l'acide gras 9-*cis*-octadécenoïc. Les lipides ligands Ni-NTA-DOGS sont livrés saturés en ions nickel. D'après Luc Lebeau du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée à Strasbourg, il n'est pas utile d'ajouter du nickel dans la sous-phase des lipides (*communication personnelle*). Cela pourrait au contraire diminuer l'adsorption des protéines en bloquant des histidines. Nous avons néanmoins travaillé dans certains cas avec un petit excès de nickel en solution (25 μM).



6-[9-[2,3-bis(dodecyloxy)propyl] -3,6,9-trioxanonyl-1-oxycarbonyl-amino] -2[di(carboxylmetyl)amino] -hexanoic acid (nickel salt)

Figure 15 : Structure du lipide NTA-DLGE (représenté sans l'ion Ni^{2+}) (Northern Lipids, Vancouver, Canada).



1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[N-(5-amino-1-carboxylpentyl) iminodiacetic acid succinyl] (nickel salt)

Figure 16 : Structure du Ni-NTA-DOGS chélatant un ion Ni^{2+} (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA)

Tous les lipides en solution sont conservés à -20°C sous argon, dans des fioles en verre fermées par un bouchon en verre pour éviter toute contamination par la dissolution des bouchons en plastique par le solvant. Certains mélanges sont conservés dans des flacons à bouchons recouverts de Teflon®. Les fioles sont préalablement nettoyées au "piranha" (mélange chauffé pendant 15 à 30 minutes de $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1) (v:v:v)). Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau ultra-pure puis au chloroforme.

II.2.2.3 Caractéristiques structurales

La chaîne aliphatique est formée par un enchaînement de liaisons C-C en "zigzag" *trans* pour la forme la plus stable. La longueur projetée d'une liaison C-C est de 0,127 nm en moyenne [Small 1986]. Une chaîne saturée rectiligne à 12 atomes de carbone mesure donc 1,53 nm et une chaîne saturée rectiligne à 18 atomes de carbone mesure 2,29 nm.

Lipide		Nombre de C	Longueur (nm)	Masse (g/mol)	Nombre d'électrons
DOPC	<i>chaîne aliphatique</i>	18	2,29	568,96	320
	<i>tête polaire</i>		1,0	223,21	120
	total		3,29	792,16	440
DOPS	<i>chaîne aliphatique</i>	18	2,29	568,96	320
	<i>tête polaire</i>		0,8	245,10	126
	total		3,09	814,06	446
DOPE	<i>chaîne aliphatique</i>	18	2,29	568,96	320
	<i>tête polaire</i>		0,9	181,13	96
	total		3,19	750,08	416
Ni-NTA-DLGE	<i>chaîne aliphatique</i>	12	1,52	370,65	226
	<i>tête polaire</i>		1,3	478,49	241
	total		2,82	849,14	467
Ni-NTA-DOGS	<i>chaîne aliphatique</i>	18	2,29	568,96	320
	<i>tête polaire</i>		~1,5	487,04	250
	total		3,8	1056,00	570

Tableau 2 : Caractéristiques des lipides et longueurs obtenues d'après [Small 1986].

Un calcul de structures de lipides nous a permis d'évaluer la longueur des têtes polaires (utilisation d'un algorithme de calcul MM2, Molecular Mechanics, [Allinger 1977]). Le Tableau 2 reporte les valeurs calculées pour les lipides utilisés. Pour les lipides Ni-NTA-DLGE, ce calcul estime à 1,52 nm les chaînes aliphatiques en configuration étirée, et à 1,3 nm l'ensemble formé par la tête polaire, le bras espaceur et le groupement NTA, soit un total de 3,0 nm pour le lipide. S. Sivasankar a déterminé l'épaisseur d'une monocouche de lipides Ni-NTA-DLGE déposée sur surface solide à 2,7 nm lors des mesures de force de surface [Sivasankar2001a] indiquant que dans ce cas, les lipides de la monocouche ne sont pas étirés et perpendiculaires à la surface mais inclinés.

II.2.3 Concentration en calcium des solutions

Les interactions entre cadhérines étant dépendantes du calcium, il est indispensable de contrôler la concentration en calcium de la solution de travail pour analyser les interactions qui peuvent avoir lieu entre les fragments de cadhérines : interactions *cis*, *trans* ou absence d'interaction. En variant la concentration environnante en calcium, il est théoriquement possible de maîtriser les interactions entre les fragments.

Les fragments de cadhérine sont ancrés à la monocouche de lipides par une liaison de coordination entre l'ion nickel d'un lipide et l'étiquette polyhistidine du fragment. Idéalement, les fragments seraient orientés perpendiculairement à la monocouche, comme l'indique la Figure 17.

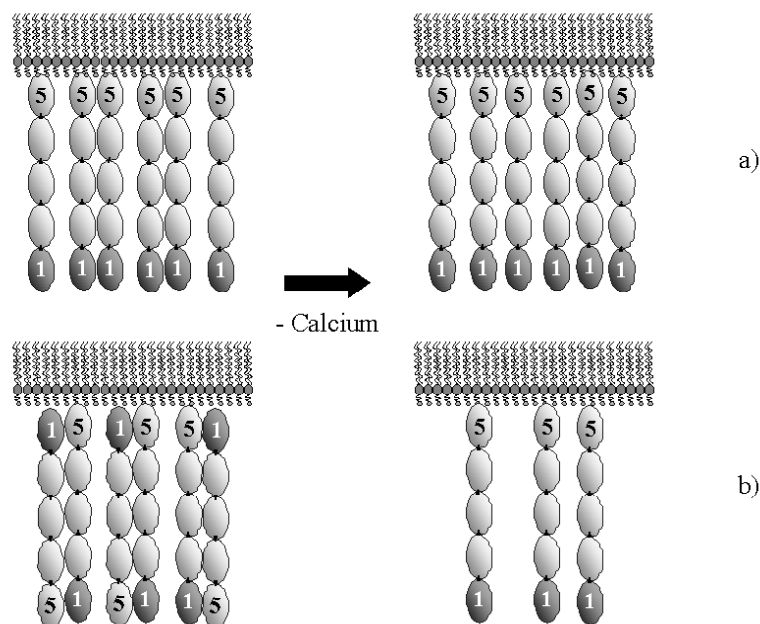


Figure 17 : Représentation schématique de couches de fragments extracellulaires de cadhérine ancrés à une monocouche de lipides. Les figures de gauche indiquent les états initiaux hypothétiques où a) les fragments sont soit sous forme de monomères, soit interagissant latéralement et b) les fragments forment des complexes antiparallèles. Les figures de droite indiquent l'évolution prévue des couches des fragments après un appauvrissement de la sous-phase en calcium.

Si l'interaction entre fragments de cadhérine est déstabilisée, il est a priori possible de distinguer les complexes *cis* des complexes *trans*. En effet, si les fragments qui sont ancrés aux lipides interagissent de manière parallèle ou sont sous forme monomérique, aucune désorption ne devrait suivre l'appauvrissement de la sous-phase en calcium car tous les fragments sont liés aux lipides (Figure 17 a). En revanche, si les fragments de cadhérine interagissent de manière antiparallèle, un appauvrissement de la sous-phase en calcium doit engendrer la désorption de la fraction de fragments impliqués dans les complexes *trans* et non liés aux lipides (Figure 17 b). Le taux de désorption devrait donc correspondre à la proportion de fragments de cadhérine impliqués dans des complexes *cis* et *trans*. Cependant, un appauvrissement trop fort de la concentration en calcium est également susceptible de dénaturer la protéine. De plus, après déstabilisation d'un complexe *trans*, il est possible que la protéine se ré-accroche à la monocouche lipidique après avoir tourné de 180°.

Nous disposons de deux méthodes pour appauvrir la solution en ions calcium (1) diluer la solution tampon avec une solution identique mais ne contenant pas ou peu de calcium; (2) ajouter dans la solution une molécule capable d'entrer en compétition avec les cadhérines vis-à-vis des ions calcium.

Deux agents chélatant d'ions divalents ont été utilisés pour supprimer les interactions dépendantes du calcium entre les cadhérines, l'EGTA⁷ et l'EDTA⁸.

⁷ EGTA : 2,2'-Ethylenedioxybis[ethyliminodi(acetic acid)], $C_{14}H_{24}O_{10}N_2$.

⁸ EDTA : Ethylenediamine-NNN'-N'-tetra-acetic acid, $C_{10}H_{16}O_8N_2$.

Cependant, ces molécules sont capables de se lier à tous les ions divalents, donc aussi aux ions Ni^{2+} . Elles peuvent ainsi déstabiliser la liaison histidine-nickel et entraîner un détachement des fragments de la monocouche.

En solution, les agents EGTA ou EDTA ainsi que le groupement NTA peuvent exister sous différents états de protonation selon le pH. A pH faible, l'état majoritaire de ces molécules est protoné quatre fois, on le notera H_4L . Les formes protonées trois fois (H_3L^-), deux fois (H_2L^{2-}), une fois (HL^{3-}) et non protonée (L^{4-}) se succèdent lorsque le pH augmente. A pH très élevé, seule la forme non protonée L existe en solution et on définit la constante d'association $K_a(\text{L-M})$ où M est un métal (ion divalent) de la réaction $\text{L} + \text{M} \rightleftharpoons \text{L-M}$ par :

$$K_a(\text{L-M}) = \frac{[\text{L-M}]}{[\text{M}][\text{L}]}.$$

Les valeurs de $K_a(\text{L-M})$ sont tabulées pour les réactions entre l'EGTA ou l'EDTA et l'ion Ca^{2+} ou Ni^{2+} (Tableau 3). A un pH quelconque, plusieurs formes protonées peuvent être présentes et il est nécessaire de définir une constante d'association apparente qui tient compte des constantes d'association des réactions mettant en jeu l'ion et les formes protonées de l'agent EGTA ou EDTA ou du groupement NTA. Il est possible de calculer les constantes de dissociation apparentes K_{Dapp}^9 pour les interactions de l'EGTA avec l'ion Ca^{2+} et l'ion Ni^{2+} dans une gamme de pH compris entre 4 et 9, ainsi que la constante de dissociation apparente pour l'interaction entre le groupement NTA et l'ion Ni^{2+} (voir Tableau 4). L'affinité de l'EGTA pour le nickel est environ 400 fois plus importante que son affinité pour le calcium, et les affinités pour l'ion Ni^{2+} du groupement NTA et de l'agent EGTA sont équivalentes. Enfin, l'affinité du groupement NTA pour l'ion calcium est négligeable [Schmitt 2000].

Il se pourrait donc que l'EGTA injecté en solution se lie préférentiellement aux ions nickel et déstabilise les liaisons entre lipides et protéines, en n'ayant pas d'effet sur les interactions entre fragments de cadhérine. Cependant, les affinités pour l'ion Ni^{2+} du groupement NTA et de l'EGTA sont très proches et le NTA n'interagit pas avec le calcium (voir Tableau 4). Pour décrocher un fragment de cadhérine d'un lipide, l'EGTA entre donc en compétition avec le groupement NTA pour l'ion nickel.

Cependant, l'ion nickel étant complexé à la fois par le lipide et par la protéine, la constante de dissociation du nickel devrait être évaluée en tenant compte de ces deux interactions. De plus, les constantes de dissociation ou d'association présentées ici sont mesurées en solution, elles sont a priori différentes des constantes de dissociation ou d'association entre molécules immobilisées sur une surface.

En conclusion, les interactions entre les agents chélatant, les ions et les cadhérines possédant une étiquette polyhistidine sont complexes. Il est par conséquent difficile d'évaluer la concentration en Ca^{2+} en solution après ajout d'EGTA sous une monocouche de cadhérine liée aux lipides par une interaction entre

⁹ c'est-à-dire l'inverse de la constante d'association apparente.

histidine et ion Ni^{2+} . Nous indiquerons donc uniquement la concentration en agent chélatant ajouté en solution, sans calcul de la concentration en calcium équivalente.

	Ni^{2+}	Ca^{2+}
EGTA	$10^{13,6}$ (1)	$10^{10,9}$ (1)
EDTA	$10^{10,7}$ (2)	$10^{18,6}$ (3)
histidine	$10^{5,5}$ (4)	-
NTA	$10^{8,7}$	-

Tableau 3 : Constantes d'association de la réaction $L + M \rightleftharpoons L-M$ où L est l'agent chélatant EGTA ou EDTA et M l'ion Ni^{2+} ou Ca^{2+} . Conditions : (1) 25°C, force ionique=0,1 (KNO_3), (2) 25°C, force ionique=0,1 (NaClO_4), (3) 20°C, force ionique=0,1 (KNO_3) [Handbook Chemistry]; (4) [Dorn 1998].

	Ni^{2+}	Ca^{2+}
EGTA	376 nM	1 nM
NTA	2 nM	-

Tableau 4 : Constantes de dissociation apparente des réactions entre l'EGTA et les ions Ni^{2+} ou Ca^{2+} (conditions : 0,1 M KCl à pH 7.0 et 20°C) et entre le groupement NTA et l'ion Ni^{2+} [Sivasankar2001a].

II.2.4 Cellules-échantillons

Les cellules échantillon doivent être adaptées à la technique de mesure expérimentale. Nous nous intéressons ici principalement aux cuves utilisées pour les expériences d'ellipsométrie et de réflectivité des rayons X et détaillerons l'appareillage de résonance des plasmons de surface dans le Chapitre V.

Les cuves utilisées pour élaborer les couches de protéines sont toutes en poly-tétrafluoroéthylène ou Teflon®. Cette matière possède l'avantage d'avoir une très faible tension de surface. La quantité de protéines perdues sur les parois est par conséquent négligeable. En revanche, la dimension du ménisque de la surface de l'eau impose une surface d'eau minimale. Les dimensions de cuves sont choisies de manière à ce que la surface de l'eau horizontale soit suffisamment grande pour permettre la mesure. Cette surface utile dépend de la technique expérimentale. La taille de la cuve doit alors être supérieure de 10 mm environ tout autour de la surface utile. La profondeur des cuves est de 3 mm, ce qui correspond à la hauteur d'une goutte d'eau déposée sur du Teflon.

Pour la réflectivité des rayons X, il est nécessaire d'avoir une grande surface dans la direction du faisceau car nous travaillons en incidence rasante. L'empreinte du faisceau est très grande aux petits angles (voir la section III.3.1.3, chapitre suivant). La cuve est un rectangle de 80 mm dans la direction du faisceau et 60 mm dans la direction transverse. Pour l'ellipsométrie, la cuve est circulaire de diamètre 30 mm, ce qui laisse une surface utile d'environ 10 mm de diamètre au centre de la cellule.

Les cuves en Teflon sont lavées régulièrement au "piranha" (voir p. 25). Entre deux expériences consécutives sur la même protéine, il peut être suffisant de

laver la cuve à l'eau, à l'éthanol, puis de l'essuyer avec un papier Whattman imbibé de chloroforme.

Deux méthodes d'injection des protéines sont possibles : soit par perçage de la monocouche de lipides à l'aide d'une micro-seringue Hamilton, soit par injection dans la sous-phase via une vanne trois voies et des tubes capillaires en Teflon connectés à des trous percés dans les parois de la cuve. La méthode du perçage est indispensable pour l'injection de faibles volumes de protéines (en-dessous de 50 μ l) à cause du volume mort de la vanne trois voies (100 μ l). Dans les deux cas, après l'injection des protéines, la sous-phase est mise en circulation par une pompe péristaltique pendant 30 minutes pour homogénéisation.

II.3 Conclusion

Nous avons décrit l'adhérence cellulaire et le rôle particulier des cadhérines dans la formation des jonctions adhérentes. Nous avons également vu que la formation d'une monocouche de fragments extracellulaires de cadhérine ancrés à une monocouche lipidique permet de les rassembler et de disposer d'un grand nombre de cadhérines orientées d'une manière similaire à leur orientation à la surface d'une cellule. Pour apporter des informations sur les interactions entre domaines extracellulaires de cadhérine, nous nous proposons d'étudier les interactions entre les fragments de cadhérine formant la monocouche et des fragments en solution. Pour ce faire, nous avons utilisé des techniques d'analyse de surface : l'ellipsométrie, la réflectivité des rayons X et la résonance des plasmons de surface. Diverses raisons ont guidé ce choix :

- l'ellipsométrie permet de suivre l'évolution des couches à la surface de l'eau, en temps réel et en terme de masse moyenne de protéines en surface;
- la réflectivité des rayons X apporte des informations structurales sur les couches dans une direction normale à la surface;
- la résonance des plasmons de surface permet d'étudier les couches déposées sur surfaces solides et d'évaluer l'évolution de la quantité de masse déposée en surface.

Ces techniques, ainsi que les méthodes d'analyse des données expérimentales d'ellipsométrie et de réflectivité des rayons X, sont présentées dans le Chapitre I. Les résultats obtenus par ces mesures seront présentés dans le Chapitre IV. L'étude de la résonance des plasmons de surface fera l'objet du Chapitre V.

Le Tableau 5 récapitule les noms des principales molécules utilisées dans ce travail.

C-cadhérine	C-EC1-5His Fc-EC1-3
VE-cadhérine	VE-EC1-4His VE-EC1-3 VE-EC2-4 VE-EC3-4
Lipides ligands	Ni-NTA-DLGE Ni-NTA-DOGS
Lipides diluants	DOPC DOPE DOPS DTPC
Molécules utilisées pour les études complémentaires	HupR Ni-NTA-BB Avidine Biotine Pyrrole Chitosane ADNdb

Tableau 5 : Molécules utilisées dans ce travail

Chapitre III Présentation des expériences

Pour étudier les monocouches de cadhérines formées à l'interface air-eau, nous avons utilisé l'ellipsométrie et la réflectivité des rayons X en incidence rasante. Parallèlement, un appareil de mesure de résonance des plasmons de surface a été développé pour l'étude de couches de molécules d'intérêt biologiques déposées sur surfaces solides. Ces trois expériences peuvent être décrites par un formalisme commun. Ce sont en effet toutes les trois des mesures spéculaires¹⁰ qui apportent une information dans un axe normal à la surface et moyennée dans le plan de la monocouche. Nous distinguons ces techniques selon le type d'information et la résolution spatiale obtenus après analyse. Dans le cas des techniques d'ellipsométrie et de résonance des plasmons de surface, la mesure donne accès à une densité surfacique moyenne de la monocouche. Par la technique de réflectivité des rayons X, la mesure donne accès à la variation de la densité électronique volumique le long d'un axe perpendiculaire à la surface de la monocouche.

Dans ce chapitre, nous présentons d'abord le formalisme décrivant l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière, suivi d'un développement particulier à chaque technique. Nous y détaillons les processus physiques entrant en jeu et les grandeurs mesurées. Puis, nous indiquons comment elles sont mesurées et quels paramètres sont déterminés. Nous discutons enfin de la précision qui peut être obtenue par ces mesures.

III.1 Equations communes

Cette section présente un formalisme commun de description de l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière. L'objectif est de mettre en parallèle les propriétés de la matière et les interactions matière-rayonnement correspondantes pour les trois techniques et de mettre ainsi en évidence les différences entre rayons X et lumière visible. Le principe de ces techniques est très simple : un faisceau de lumière X ou visible est dirigé sur la surface avec un angle d'incidence donné. Un détecteur récolte le faisceau réfléchi dans la direction spéculaire. Les propriétés du faisceau réfléchi sont liées à celles du faisceau incident et à celle de l'échantillon : longueur d'onde, angle d'incidence et polari-

¹⁰ c'est-à-dire que l'angle réfléchi est égal à l'angle d'incidence

sation du faisceau, distribution de densité de matière dans l'axe normal à la surface.

Suite aux travaux fondateurs de A. Fresnel, de nombreux auteurs ont décrit l'interaction entre un champ électromagnétique et une surface [voir par exemple Born Wolf 1985]. L.-G. Parratt a décrit en particulier la réflectivité des rayons X [Parratt 1954]. J. Als-Nielsen a largement présenté l'utilisation des rayons X en incidence rasante pour l'étude de couches de molécules d'intérêt biologique [Als-Nielsen 1991], puis l'intérêt du rayonnement synchrotron pour ces études [Als-Nielsen 1994]. Plus récemment, D. Vaknin a fait un état des lieux des techniques de diffraction X spécialement utilisées pour l'étude des surfaces liquides [Vaknin 2001]. M. Lösche [Lösche 2002] décrit plus particulièrement l'utilisation des rayons X et des neutrons pour l'étude des membranes modèles de lipides et des interactions lipides-protéines. L'ellipsométrie a été discutée par R. Azzam et N. Bassara [Azzam 1977].

III.1.1 Description par les matrices d'Abélès

Nous nous sommes intéressées à la description de W. Hansen [Hansen 1968] qui explicite le champ électromagnétique après réflexion sur un nombre quelconque d'interfaces successives supposées infinies et planes (sans rugosités aux interfaces). Ce travail nous a permis d'écrire un programme qui calcule le champ électromagnétique résultant à la surface.

W. Hansen utilise la représentation matricielle d'Abélès pour décrire un système composé de N couches dont les deux extrêmes sont semi-infinies [Abélès 1950]. Un tel système est appelé *système à N phases*. Chaque phase d'épaisseur h est caractérisée par trois paramètres suffisant à caractériser le matériau : sa constante diélectrique ou permittivité ε , sa conductivité σ et sa perméabilité magnétique μ . Ces constantes dépendent de la longueur d'onde dans le vide λ du faisceau incident et nous amèneront à séparer par la suite la réflectivité des rayons X de l'ellipsométrie et de la création des plasmons de surface impliquant la lumière visible. Les matériaux que nous étudions nous permettent de négliger leur perméabilité magnétique, soit $\mu=1$. Dans nos modèles, la première couche est le milieu ambiant (air, verre) et la $N^{\text{ième}}$ le substrat (eau); les $N-2$ couches intermédiaires sont constituées de protéines, lipides, alcanes-thiol, métal selon les cas. Pour reprendre les notations de W. Hansen, nous définissons pour chaque couche j une constante diélectrique complexe $\hat{\varepsilon}_j$:

$$\hat{\varepsilon}_j = \varepsilon_j + i \frac{4\pi\sigma_j}{\omega}, \text{ où } \omega \text{ est la fréquence angulaire } \omega = \frac{2\pi c}{\lambda}.$$

L'indice optique complexe \tilde{n}_j est relié à ces quantités par $\tilde{n}_j^2 = \mu_j \hat{\varepsilon}_j$, ou ici simplement $\tilde{n}_j^2 = \hat{\varepsilon}_j$. La partie réelle de cet indice complexe est l'indice de réfraction habituel n_j , sa partie imaginaire est le coefficient d'extinction κ_j . Un système stratifié est par conséquent défini par un ensemble de triplets $(\varepsilon, \sigma, h)_j$ ou $(n, \kappa, h)_j$ correspondant aux couches qui le composent.

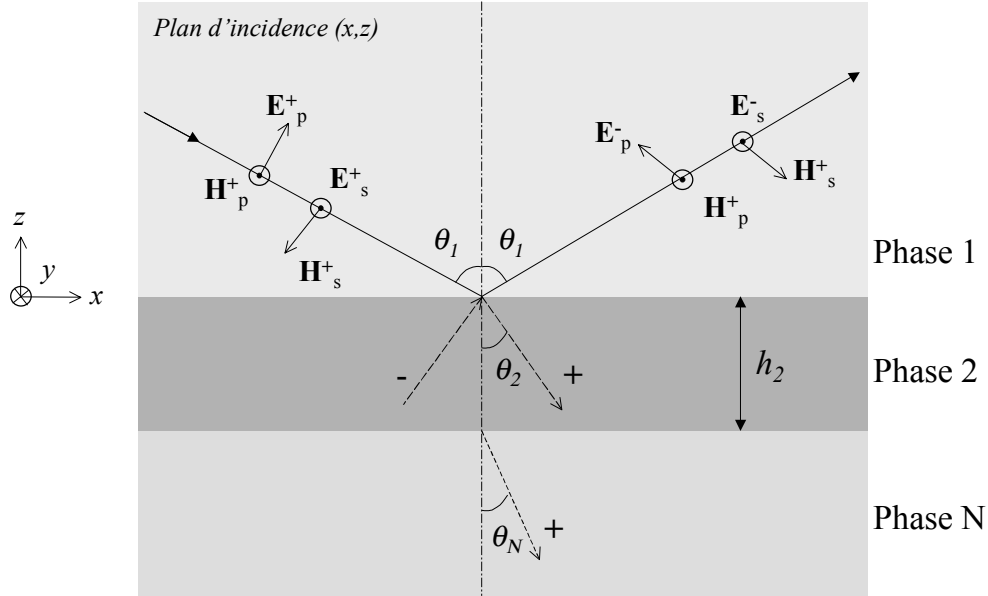


Figure 18 : Schéma représentant l'interaction d'une onde électromagnétique incidente sur un système stratifié (ici à trois phases seulement) selon sa polarisation p ou s . A chaque interface, une partie du faisceau incident est transmis dans la couche inférieure (+), une autre réfléchi (-). Définition du repère (xyz) : (x,y) plan des interfaces, (x,z) plan d'incidence et z est la direction normale aux interfaces.

Considérons un système stratifié sur lequel se réfléchit une onde électromagnétique plane faisant un angle d'incidence θ_i par rapport à la normale à la surface (voir Figure 18). A chaque interface, une partie de l'onde est réfléchi, l'autre est transmise. Le champ électrique \mathbf{E} en un point \mathbf{r} de l'espace et au temps t s'écrit :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \sum_{\alpha} \mathbf{E}_{\alpha} e^{i(\mathbf{k}_{\alpha} \cdot \mathbf{r} - \omega t)} \quad \text{où } \alpha \text{ désigne le sens de propagation de l'onde (+ sens incident, - sens réfléchi), } \mathbf{k}_{\alpha} \text{ le vecteur d'onde et } \omega \text{ la pulsation de l'onde.}$$

Le vecteur \mathbf{E}_{α} décrit la polarisation¹¹ de l'onde. Pour la polarisation perpendiculaire au plan d'incidence dite *Transverse Electrique* TE ou s :

$$\mathbf{E}_{\alpha} = E_{y\alpha} \mathbf{y} \quad \text{où } E_{y\alpha} \text{ est l'amplitude de la composante du champ électromagnétique selon } \mathbf{y}. \text{ Dans ce cas, le champ magnétique } \mathbf{H} \text{ est dans le plan } (\mathbf{x}, \mathbf{z}).$$

Pour la polarisation parallèle au plan d'incidence appelée *Transverse Magnétique* TM ou p :

$$\mathbf{E}_{\alpha} = E_{x\alpha} \mathbf{x} + E_{z\alpha} \mathbf{z} \quad \text{où } E_{x\alpha} \text{ et } E_{z\alpha} \text{ sont les amplitudes des composantes selon } \mathbf{x} \text{ et } \mathbf{z} \text{ du champ électromagnétique. Le champ magnétique est alors dirigé selon } \mathbf{y}.$$

¹¹ Voir la définition en Annexe 3.

Les coefficients de réflexion du système sont définis par le rapport des amplitudes de composantes tangentielles du champ électromagnétique incident (+) et réfléchi sur le système (-) pour chaque polarisation:

$$r_s = \frac{E_{y-}}{E_{y+}} \quad \text{polarisation } s,$$

$$\text{et } r_p = \frac{H_{x-}}{H_{x+}} \quad \text{polarisation } p.$$

Expérimentalement, nous avons accès à l'intensité réfléchie qui est fonction des carrés de ces coefficients. Pour comparer expérience et théorie, il est nécessaire d'exprimer le champ réfléchi par le système entier en fonction des paramètres des N couches pour calculer r_s et r_p .

Toutes les couches, sauf la première et la dernière, sont représentées par des matrices de passage M_j , $1 < j < N$, qui relient entre elles les amplitudes des composantes tangentielles du champ électromagnétique à l'interface entre les phases j et $j+1$. Les amplitudes U_1 et V_1 des composantes tangentielles du champ résultant à la première interface (soit air-eau ou verre-métal pour nous) sont reliées à celles U_{N-1} et V_{N-1} du champ résultant à la dernière interface (couche-substrat) par la relation :

$$\begin{bmatrix} U_1 \\ V_1 \end{bmatrix} = \prod_{j=2}^{N-1} M_j \begin{bmatrix} U_{N-1} \\ V_{N-1} \end{bmatrix} \quad \text{Équation 1.}$$

Nous notons $\{m_{11}, m_{12}, m_{21}, m_{22}\}$ les éléments de la matrice résultante M définie par le produit des matrices de passage M_j :

$$M = \prod_{j=2}^{N-1} M_j = \begin{pmatrix} m_{11} & m_{21} \\ m_{12} & m_{22} \end{pmatrix}.$$

Dans le cas d'une onde polarisée s, les composantes tangentielles du champ électromagnétique sont E_y et H_x , soit $U_i = E_{yi}$ et $V_i = H_{xi}$ avec $i=1$ ou $N-1$. La continuité de ces composantes du champ électromagnétique à l'interface conduit à la définition des matrices de passage M_j pour la polarisation s:

$$M_j = \begin{pmatrix} \cos \beta_j & -\frac{i}{p_j} \sin \beta_j \\ -ip_j \sin \beta_j & \cos \beta_j \end{pmatrix} \quad \text{où } p_j = \sqrt{\frac{\epsilon_j}{\mu_j}} \cos \theta_j \text{ et } \beta_j = \frac{2\pi}{\lambda} \tilde{n}_j \cos \theta_j h_j$$

Si l'onde est polarisée p, les composantes tangentielles sont E_x et H_y , soit $U_i = H_{yi}$ et $V_i = E_{xi}$ avec $i=1$ ou $N-1$. Les matrices M_j s'écrivent pour la polarisation p :

$$M_j = \begin{pmatrix} \cos \beta_j & -\frac{i}{q_j} \sin \beta_j \\ -iq_j \sin \beta_j & \cos \beta_j \end{pmatrix} \quad \text{où } q_j = \sqrt{\frac{\mu_j}{\epsilon_j}} \cos \theta_j$$

Il est ainsi possible d'évaluer à chaque interface le champ électromagnétique selon sa polarisation et de calculer les coefficients r_s et r_p .

En développant l'Équation 1 et en utilisant l'équation de Maxwell $\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}$, il est possible d'obtenir une expression générale coefficients de réflexion r_s et r_p en fonction des éléments de la matrice résultante M :

$$r_s = \frac{(m_{11} + m_{12}p_N) \cdot p_1 - (m_{21} + m_{22}p_N)}{(m_{11} + m_{12}p_N) \cdot p_1 + (m_{21} + m_{22}p_N)} \quad \text{Équation 2 : polarisation } s,$$

$$r_p = \frac{(m_{11} + m_{12}q_N) \cdot q_1 - (m_{21} + m_{22}q_N)}{(m_{11} + m_{12}q_N) \cdot q_1 + (m_{21} + m_{22}q_N)} \quad \text{Équation 3 : polarisation } p.$$

En conclusion, les coefficients de réflexion de l'onde électromagnétique sur un système stratifié dépendent uniquement de l'angle d'incidence de l'onde et des paramètres du système que sont la constante diélectrique complexe et l'épaisseur de chaque couche, c'est-à-dire les triplets $(\epsilon, \sigma, d)_j$ ou $(n, \kappa, d)_j$. Or, la constante diélectrique dépend de manière générale de la densité électronique dans le matériau. Par conséquent, une mesure de l'intensité du champ électromagnétique réfléchi sur un système contient l'information sur la distribution spatiale selon l'axe z des densités électronique des matériaux qui le composent, les couches du système étant supposées homogènes dans le plan (x,y) . A partir des équations que nous venons de présenter, nous avons écrit un programme qui permet de modéliser les grandeurs mesurées ou obtenues par l'expérience. Ce programme calcule le produit matriciel $M = M_2 M_3 \dots M_{N-1}$ puis les coefficients de réflexion r_s et r_p en fonction des paramètres des N couches du système à modéliser. Nous présenterons dans la section suivante les particularités des techniques que nous avons utilisées et les relations entre les coefficients r_s et r_p et les grandeurs propres à chaque expérience. Il existe d'autres descriptions matricielles de l'interaction d'une onde électromagnétique sur un système stratifiée, comme celle décrite par A. Gibaud [Gibaud 1999].

III.1.2 Expressions développées exactes des coefficients r_s et r_p

Une expression exacte des coefficients r_p et r_s peut être calculée pour quelques systèmes simples. Dans le cas d'une interface unique, le calcul conduit aux relations de Fresnel pour les polarisations s et p :

$$r_s = \frac{\tilde{n}_1 \cos \theta_1 - \tilde{n}_2 \cos \theta_2}{\tilde{n}_1 \cos \theta_1 + \tilde{n}_2 \cos \theta_2} \quad \text{et} \quad r_p = \frac{\hat{\epsilon}_2 \tilde{n}_1 \cos \theta_1 - \hat{\epsilon}_1 \tilde{n}_2 \cos \theta_2}{\hat{\epsilon}_2 \tilde{n}_1 \cos \theta_1 + \hat{\epsilon}_1 \tilde{n}_2 \cos \theta_2}.$$

Des expressions décrivant un système à deux ou trois interfaces c'est-à-dire composé d'une ou deux couche(s) mince(s) déposée(s) sur un substrat semi-infini peuvent aussi être dérivées [Gibaud 1999].

III.1.3 La rugosité

Une interface réelle n'est pas parfaitement plane. La rugosité d'une surface cristalline est statique et due à des marches entre les plans cristallins ou à des impuretés. La rugosité d'une surface libre de liquide est due aux fluctuations thermiques. Elle peut être décrite comme composée d'une rugosité locale égale à la taille de la molécule composant le liquide et d'une rugosité due aux ondes

capillaires. Les ondes capillaires sont des ondes de surfaces excitées thermiquement et dont le spectre est déterminé par la gravité et la tension de surface du liquide [Braslau 1988]. Compte tenu des longueurs d'onde utilisées comparé au spectre des ondes capillaires, nous prenons en compte la rugosité dans la description de la réflectivité X, mais nous la négligerons dans les descriptions de l'ellipsométrie et de la résonance des plasmons de surface. Dans le cas de l'interaction rayons X-matière, il est nécessaire d'entrer en détails dans la description de la diffusion pour tenir compte de la rugosité [Braslau 1988]. A. Gibaud décrit une méthode permettant d'intégrer directement la rugosité dans les éléments de matrice décrits précédemment [Gibaud 1999].

Il est possible d'intégrer la rugosité d'une interface dans le formalisme que nous venons de décrire. Une vue simplifiée consiste à remplacer la rugosité par une couche équivalente supplémentaire entre les deux milieux [Azzam 1977]. L'épaisseur de la couche correspond à l'épaisseur caractéristique de la rugosité. Un indice de réfraction complexe effectif est attribué à cette couche intermédiaire. Il peut être exprimé en fonction des fractions volumiques des deux milieux et de leur indice de réfraction respectif. Plusieurs théories décrivent cette fonction selon la manière dont sont mélangés les deux constituants. Ainsi, la théorie de Maxwell Garnet considère une distribution aléatoire de particules sphériques déposées sur la surface et dont l'indice de réfraction effectif est calculé à partir des indices du milieu ambiant et du substrat [Maxwell Garnet 1904, Azzam 1977]. Cette approche permet de prendre en compte la rugosité dans le cas de l'ellipsométrie ou de la résonance des plasmons de surface.

III.1.4 Une autre description des coefficients de réflexion

La description matricielle de l'interaction des rayons X avec le système stratifié n'en donne pas une bonne image physique. Une approche cinématique plus élégante a été largement décrite (par exemple [Als-Nielsen 1991]). Dans cette description, la réflectivité est la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation de la dérivée du profil de densité électronique. Les ondes réfléchies aux interfaces interfèrent résultant en des oscillations d'amplitude reliée à la différence de densité électronique des matériaux, et de période liée à l'épaisseur de couche par la relation de Bragg se réduisant à $d = \frac{2\pi}{q_z}$. La rugosité de l'interface

engendre une atténuation de l'intensité réfléchie à la manière d'un facteur de Debye-Waller $\exp(-q_z^2 \sigma^2)$.

I. Parratt a calculé la réflectivité d'un système composé de N couches par récurrence [Parratt 1954]. Le coefficient de réflexion entre la dernière couche et le substrat est égal à 0, puis les coefficients de réflexion entre deux couches consécutives s'expriment en fonction de celui de l'interface inférieure. L'avantage de ce calcul est qu'il permet de tenir compte de la rugosité des interfaces. Les N couches sont supposées homogènes. La formule de récurrence pour le coefficient de réflexion pour la polarisation s entre les couches $n-1$ et n s'écrit :

$$R_{j-1,j} = a_{j-1}^2 \frac{R_{j,j+1} + r_{j-1,j} \cdot e^{\frac{k_{j-1} \cdot k_j \cdot \sigma_{j-1,j}^2}{2}}}{1 + R_{j,j+1} \cdot r_{j-1,j} \cdot e^{\frac{k_{j-1} \cdot k_j \cdot \sigma_{j-1,j}^2}{2}}},$$

où $r_{j-1,j} = \frac{k_{zj-1} - k_{zj}}{k_{zj-1} + k_{zj}}$ sont les coefficients de Fresnel pour l'interface entre les couches j et $j-1$,

k_{zj} est la composante selon z du vecteur de diffusion dans le milieu j ,

$a_j = e^{-ik_{zj} \cdot d_j}$ est le facteur de déphasage apporté par la couche j d'épaisseur d_j ,

et $\sigma_{j-1,j}$ est la rugosité de l'interface entre les couches j et $j-1$.

La réflectivité résultante sur le système est égale au module carré du coefficient $R_{0,1}$. Cet algorithme est utilisé par le programme *RefX* de R. Ober [Bardon 1999] que nous présenterons plus loin de ce chapitre.

III.2 Programmes d'analyse des données

Nous avons écrit des programmes de calcul de courbes théoriques décrivant les expériences que nous avons faites : réflectivité X, ellipsométrie et SPR. Ils ont été écrits sous forme de "macros" exécutées par le logiciel Igor (Igor Pro, Wavemetrics, Inc.).

Un programme général, que nous avons appelé "*Fresnel*", s'appuyant sur le travail de W. Hansen, permet de modéliser les trois expériences pour un nombre quelconque de couches. Dans ce travail, il est utilisé pour modéliser les courbes d'ellipsométrie et de résonance des plasmons de surface et les comparer aux courbes expérimentales. A l'heure de l'écriture de ce manuscrit, il ne réalise pas d'ajustement automatique des paramètres pour trouver la courbe théorique la plus proche des données expérimentales. Bien qu'il soit parfaitement capable de décrire également les courbes de réflectivité X, nous avons choisi deux autres programmes pour les analyser. Ce sont le logiciel "*Parratt32*" du Hahn-Meitner-Institut (H.M.I.) de Berlin [Parratt32] et un programme, que nous nommerons "*RefX*" dans ce manuscrit, écrit par Raymond Ober du laboratoire Physique de la Matière Condensée du Collège de France [Bardon 1999]. Les raisons de ces choix sont que notre calcul ne prend pas en compte la rugosité des interfaces. C'est une bonne approximation pour l'interaction de la lumière visible avec la matière, mais pas dans le cas des rayons X pour lesquels la dimension caractéristique de la rugosité est comparable à la longueur d'onde. De plus, ces deux autres programmes minimisent numériquement l'écart entre la courbe théorique et la courbe expérimentale, ce que notre programme ne cherche pas à faire.

Un second programme de modélisation des expériences d'ellipsométrie a été écrit d'après H. Tompkins [Tompkins 1993] et F. McCrackin [McCrackin 1969]. H. Tompkins propose un programme qui calcule des trajectoires de ψ et Δ , c'est-à-dire des courbes paramétriques de ψ et Δ en fonction de l'épaisseur d'une couche, tous les indices étant connus. Nous l'avons adapté pour calculer les varia-

tions de ψ et Δ en fonction de l'angle d'incidence du faisceau ou de la longueur d'onde, en laissant à l'utilisateur la possibilité de faire varier les valeurs des indices et des épaisseurs des couches. Ce programme peut modéliser jusqu'à trois couches déposées sur un substrat.

Des courbes théoriques de résonance des plasmons de surface ont été calculées par un programme fondé sur celui présenté par R. Corn et utilisant les équations de W. Hansen [Corn 2002]. Il calcule le coefficient de réflexion de la lumière polarisée p sur un système à 4 phases (verre, métal, couche mince, air ou eau).

III.2.1 Programme *Parratt32*

Ce programme a été écrit par Christian Braun du H.M.I. et peut être trouvé sur le site Internet de l'institut [Parratt32]. Le calcul de la réflectivité est effectué à partir de la description dynamique de L.G. Parratt [Parratt1954]. Chaque couche est décrite par quatre paramètres : épaisseur, densité électronique reliée à la partie réelle de l'indice de réfraction complexe, partie imaginaire liée à l'adsorption, rugosité de l'interface. Les rugosités aux interfaces sont prises en compte dans les coefficients de Fresnel selon l'approche de L. Névoit et P. Croce [Névoit 1980]. Le profil de densité électronique correspondant aux couches est calculé en incluant les rugosités par une fonction erreur gaussienne. La rugosité des interfaces est décrite par une gaussienne dont la largeur à mi-hauteur est la rugosité moyenne. Les paramètres des couches sont variés pour ajuster la courbe calculée à la courbe expérimentale selon un algorithme de minimisation (méthode de Newton-Raphson simplifiée à une dimension). Ce programme est utilisé avec succès pour décrire les courbes de réflectivité des rayons X mesurées sur les monocouches de lipides seuls. Son avantage principal est que les couches du profil de densité électronique correspondent aux entités chimiques du système étudié.

III.2.2 Programme *RefX* de R. Ober

Ce programme calcule par récurrence la réflectivité d'un système stratifié en utilisant les formules de Fresnel généralisées [Parratt 1954]. Contrairement à *Parratt32*, des couches minces de largeur identique décrivent le système par des strates. La largeur des couches n'est pas ajustée par ce programme et peut être choisie proche de la résolution expérimentale définie par la relation $R=\pi/q_{max}$, où R est la résolution et q_{max} le vecteur de diffusion maximal atteint lors de l'expérience. La densité électronique, l'absorption et la rugosité de chaque couche peuvent être ajustées pour obtenir une courbe de réflectivité proche de la mesure. Nous avons toujours fixé la rugosité à 0 et négligé l'absorption pour ne pas augmenter le nombre de paramètres d'ajustement. Ce programme permet donc d'obtenir des profils de densité électronique quasi-continu décrivant les couches lipoprotéiques. Une description de ce programme peut être trouvée dans [Bardon 1999].

III.2.3 Conclusion

Les courbes calculées présentées dans ce travail proviennent pour l'ellipsométrie et pour la résonance des plasmons de surface du programme général *Fresnel* et pour la réflectivité des programmes *Parratt32* ou *RefX* selon la complexité du système à analyser. Dans les profils de densité électronique présentés, l'origine des distances correspond à l'interface entre l'air et la première couche (eau ou lipides). Les distances ou profondeurs sont ensuite comptées positivement en direction du substrat.

III.3 Descriptions des techniques expérimentales

Pour que chacune de nos expériences puisse être décrite par les équations décrites dans la section précédente, il est nécessaire de définir les constantes diélectriques complexes $\hat{\epsilon}$ des matériaux en fonction de la longueur d'onde de l'onde électromagnétique incidente. D'autre part, il est nécessaire de relier aux équations générales la grandeur mesurée qui est une fonction de l'intensité réfléchie et de la polarisation de l'onde incidente.

La constante diélectrique complexe $\hat{\epsilon}(\omega)$ ¹² d'un matériau caractérise la réponse du matériau à l'excitation produite par un champ électromagnétique environnant. Elle varie fortement en fonction de la fréquence de l'excitation. La Figure 126 de l'Annexe 3 présente l'exemple des variations des parties réelle et imaginaire de l'indice de réfraction complexe de l'eau en fonction de la fréquence de l'onde électromagnétique incidente : $\tilde{n}(\omega) = n(\omega) + i\kappa(\omega) = (\hat{\epsilon}(\omega))^{1/2}$. Dans le visible, les variations de l'indice de réfraction complexe de l'eau sont limitées : l'absorption est très faible et l'indice de réfraction est constant, égal à 1,33. Aux longueurs d'onde des rayons X, l'indice de réfraction est très légèrement inférieur à 1 et l'absorption est faible. En première approximation, la partie réelle de la constante diélectrique ou de l'indice de réfraction complexe dépend seulement de la densité électronique du matériau et sa partie imaginaire de l'absorption du matériau. Dans les sections suivantes, nous explicitons les indices de réfraction complexes en fonction de la densité et de l'absorption du matériau et de la longueur d'onde de la lumière utilisée pour chacune des expériences.

La polarisation¹³ du champ électromagnétique est définie par le dispositif expérimental. Le faisceau de rayonnement synchrotron de l'ESRF est linéairement polarisé horizontalement. Le faisceau de rayons X est donc polarisé *s* par rapport à la surface de l'eau. Le coefficient de réflexion r_s est utilisé pour décrire la réflectivité des rayons X. Le faisceau de lumière utilisé en ellipsométrie est polarisé elliptiquement, par conséquent les deux coefficients de réflexion r_s et r_p sont utilisés pour simuler les courbes d'ellipsométrie. Le cas de la résonance des plasmons de surface est traité en détails dans le Chapitre V. Pour créer des plasmons de surface, le faisceau de lumière incidente doit être linéairement

¹² ω est la pulsation du champ électromagnétique incident, $\omega = 2\pi/\lambda$.

¹³ voir Annexe 3.

polarisé p et nous utilisons donc le coefficient de réflexion r_p pour décrire la résonance des plasmons de surface.

III.3.1 Réflectivité des rayons X

III.3.1.1 Adaptation des équations générales

L'indice de réfraction complexe de la matière pour les rayons X s'écrit

$$\tilde{n} = 1 - \delta + i\beta \quad \text{avec} \quad \delta = \frac{\lambda^2}{2\pi} r_e \rho_e \quad \text{et} \quad \beta = \frac{\lambda^2}{4\pi} r_e \mu$$

où r_e est le rayon classique de l'électron, $r_e = 2,81 \cdot 10^{-15}$ m, ρ_e la densité électronique et μ le coefficient d'absorption du matériau. Notons les ordres de grandeur $\delta \sim 10^{-5}$ et $\beta \sim 10^{-6}$ pour la plupart des matériaux. Pour l'eau à une longueur d'onde $\lambda = 1,54$ Å, $\delta = 3,61 \cdot 10^{-6}$ et $\beta = 1,23 \cdot 10^{-8}$ [Gibaud 1999].

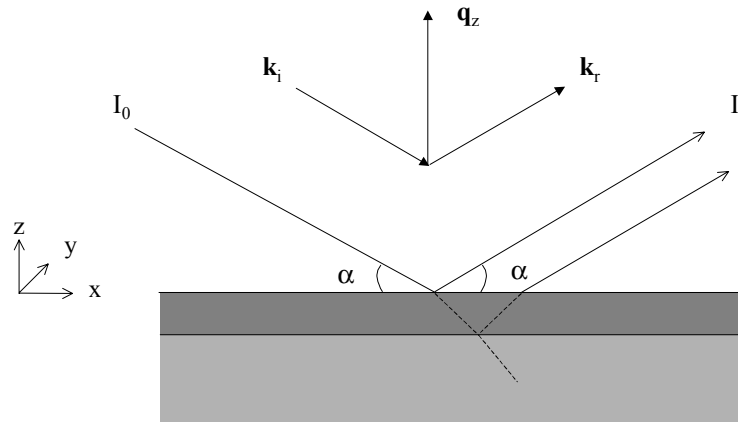


Figure 19 : Notations employées pour la description de la réflectivité X. I_0 : intensité du faisceau incident, I_r : intensité du faisceau réfléchi.

Dans le cas de la réflectivité spéculaire, le vecteur de diffusion $\mathbf{q} = \mathbf{k}_r - \mathbf{k}_i$ a uniquement une composante dans la direction z perpendiculaire à la surface de module $q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \alpha$ (Figure 19). La diffusion dans les autres directions est due à la rugosité de la surface et nous ne nous y intéressons pas dans ce travail. Le vecteur de diffusion critique¹⁴ q_c dépend uniquement de la densité électronique du matériau : $q_c = 4\sqrt{\frac{r_e}{\pi}} \sqrt{\rho_e}$. La densité électronique de l'eau est égale à $\rho_e = 0,334$ e.Å⁻³ et le vecteur de diffusion critique de l'eau est $0,0217$ Å⁻¹.

La résolution d'une mesure de réflectivité des rayons X est limitée par la géométrie de l'expérience et définie par la relation $R = \pi/q_{max}$, où R est la résolution et q_{max} le plus grand vecteur de diffusion mesuré. Lors des expériences que nous avons réalisées, la résolution était entre 6 Å et 12 Å selon les expériences, soit environ 10 fois la longueur d'onde utilisée. Notons que traditionnellement,

¹⁴ Voir Annexe 3.

les longueurs d'onde de rayons X sont exprimées en Å au lieu de l'unité légale qu'est le nanomètre, et les vecteurs de diffusion sont exprimés en Å⁻¹.

III.3.1.2 Courbes caractéristiques

Nous présentons ici des courbes théoriques modélisant la réflectivité X sur des systèmes typiques composés d'eau, puis de lipides à la surface de l'eau, enfin augmenté d'une couche de protéine sous les lipides. Pour ces différents profils de densité électronique, les courbes de réflectivité X ont été calculées par le programme *Parratt32*.

Eau seule

Deux courbes théoriques de réflectivité X sur l'eau pure sont présentées sur la Figure 20. Les courbes ont été calculées en utilisant un modèle à une interface dans lequel les deux phases sont l'air et l'eau (voir Figure 23 a).

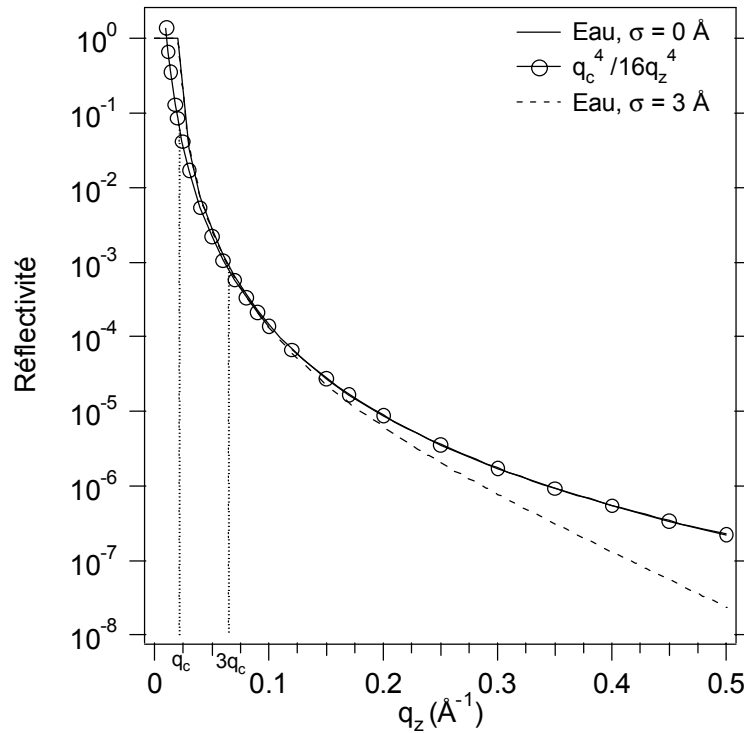


Figure 20 : Réflectivité calculée sur un système à une interface représentant l'eau avec et sans rugosité, comparé à une décroissance en q_z^{-4} .

La réflexion totale est visible en dessous du vecteur de diffusion critique de l'eau à $q_z = 0,0217 \text{ Å}^{-1}$. L'intensité réfléchi décroît en q_z^{-4} quand le vecteur de diffusion augmente. Sur la Figure 20, sont comparées une courbe de réflectivité sur une interface parfaitement plane (courbe pleine) et la fonction $q_c^4 / 16q_z^4$ (symboles). Les deux courbes se superposent pour des vecteurs de diffusion supérieurs à environ $3q_c$. Pour une meilleure description de la réflectivité sur une surface d'eau réelle, il est nécessaire de tenir compte de la rugosité. La réflectivité sur l'eau est abaissée par la rugosité de sa surface décrite par un paramètre σ dont la valeur expérimentale est d'environ 3 Å à température ambiante [Braslau 1988] (courbe en pointillés de la Figure 20).

Monocouche de lipides déposés sur à la surface de l' eau

Une courbe typique de réflectivité sur une monocouche de lipides est représentée sur la Figure 21 et comparé à la réflectivité sur l'eau seule. La monocouche de lipides est modélisée ici simplement par un système à deux interfaces, une phase intermédiaire d'épaisseur 2,5 nm et de densité électronique $\rho_e=0,5 \text{ e.Å}^{-3}$ s'intercalant entre l'air et l'eau (voir Figure 23 b). Les rugosités des interfaces ont été fixées à 3 Å. La courbe de réflectivité présente des oscillations dont l'amplitude est proportionnelle au carré de la différence entre la densité électronique des lipides et celle de l'eau. La période Δq de ces interférences est inversement proportionnelle à l'épaisseur d de la couche, $\Delta q=2\pi/d$. En pratique, deux couches sont nécessaires pour décrire correctement une monocouche de lipides. La première couche caractérise les chaînes aliphatiques dont la densité électronique est inférieure à celle de l'eau (typiquement $0,27 \text{ e.Å}^{-3}$ [Als-Nielsen 1991]). La deuxième couche décrit les têtes polaires dont la densité électronique peut varier de $0,4 \text{ e.Å}^{-3}$ à $0,5 \text{ e.Å}^{-3}$ selon le groupement [Als-Nielsen 1991].

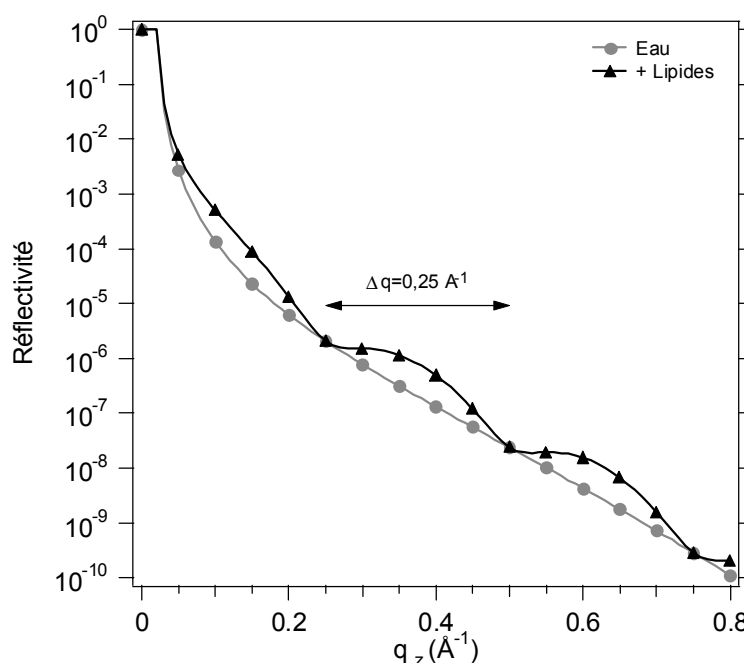


Figure 21 : Comparaison des courbes de réflectivité calculées sur une interface (deux phases : eau, air) et sur un système à deux interfaces (trois phases : eau, lipides, air).

Monocouche de protéines ancrés à des lipides

Une courbe théorique de réflectivité X sur une couche homogène de protéines déposées sous une monocouche de lipides est présentée sur la Figure 22. La couche lipide+protéine est décrite par un système à trois interfaces, une couche d'épaisseur 10 nm et de densité électronique $0,4 \text{ e.Å}^{-3}$ étant située entre l'eau et la couche de lipides (voir Figure 23 c). La présence de la protéine se manifeste par des interférences de plus courte période que celles correspondant à la couche de lipides puisque la couche de protéines est plus épaisse que la couche de lipides. L'amplitude de ces oscillations est plus faible car la densité de la protéine est proche de celle de l'eau. Les rugosités des interfaces ont été fixées à 3 Å.

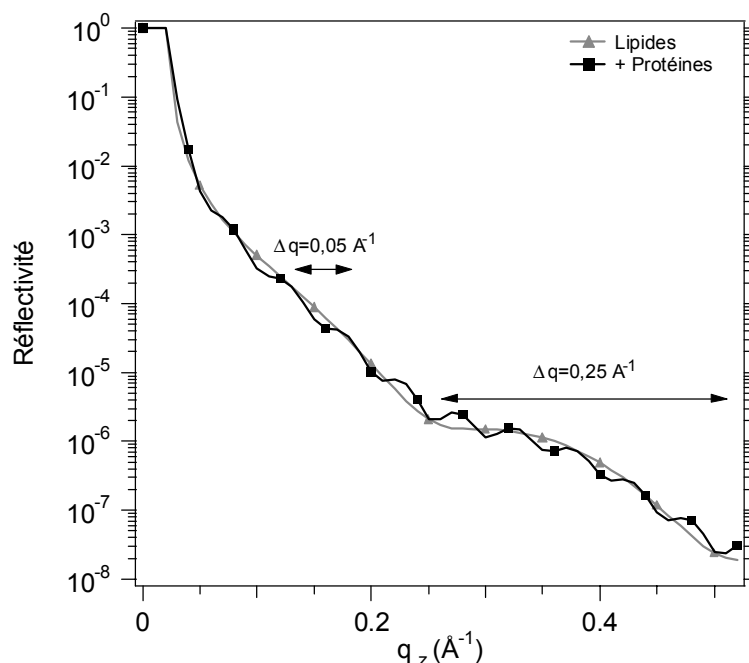


Figure 22 : Comparaison des courbes de réflectivité calculées sur un système à deux ou trois interfaces : c'est-à-dire trois phases (eau, lipides, air) ou quatre phases (eau, protéines, lipides, air).

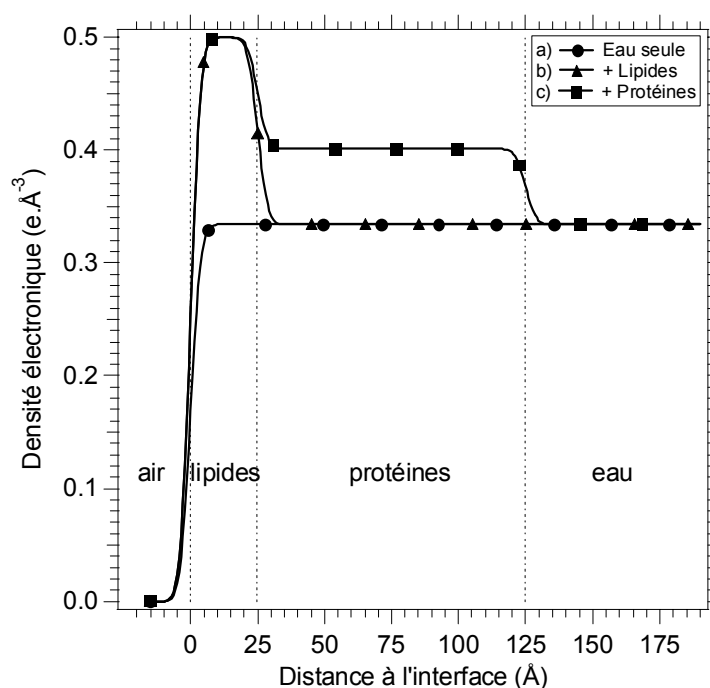


Figure 23 : Profils de densité électronique correspondant aux courbes de réflectivité des figures précédentes : a) système à une interface (eau-air), b) à deux interfaces (eau-lipide-air) et c) à trois interfaces (eau-protéine-lipide-air). La rugosité des interfaces est 3 Å.

Un cas réel : la protéine HupR ancrée à une monocouche de lipides

Les profils simples présentés sont insuffisants pour décrire correctement une couche réelle de protéine. La Figure 24 présente l'exemple d'une mesure expérimentale de réflectivité des rayons X effectuée sur une monocouche de la protéine

HupR¹⁵ ancrée à des lipides ligands possédant un groupement NTA chélatant un ion nickel, les lipides Ni-NTA-BB¹⁵ [Courty 2002].

Pour ces expériences, la protéine HupR a été surexprimée au Département de Biologie Moléculaire et Structurale¹⁶ du CEA-Grenoble. Elle était diluée à une concentration de 25 µg/ml dans une solution aqueuse tamponnée (20 mM Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 8). La protéine a été injectée sous une monocouche du mélange de lipides Ni-NTA-BB:DOPC (1:3).

Une modélisation des courbes expérimentales avec et sans protéine par un programme similaire à *Parratt32* a permis de reproduire les principales caractéristiques de la courbe de réflectivité X (Figure 24). Elle utilise un système simple à trois couches : chaînes aliphatiques, têtes polaires + groupement NTA, protéines. Les paramètres du profil de densité électronique ayant servi à calculer les courbes de réflectivité sont présentés dans le Tableau 6. Les paramètres décrivant les lipides seuls ont été déterminés dans un premier temps à partir de la courbe de réflectivité sans protéines (couches 1 et 2). Puis, ces paramètres étant fixés, les paramètres décrivant la couche de protéines ont été déterminés à partir de la courbe de réflectivité avec protéine (couche 3). La Figure 25 présente la courbe de réflectivité X avec protéine accompagnée d'un ajustement effectué par le programme *RefX*. Le profil de densité électronique correspondant est présenté sur la Figure 26.

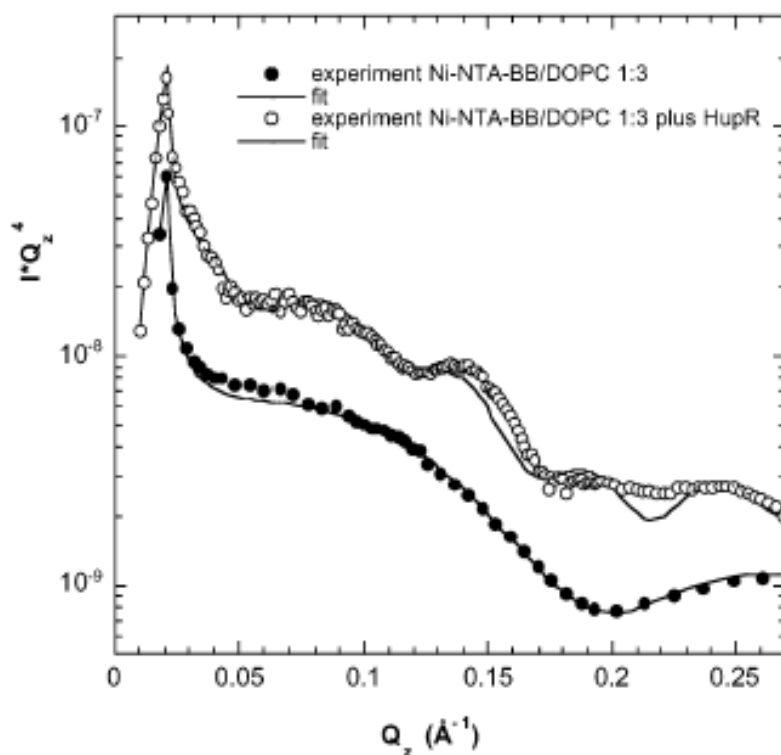


Figure 24 : Courbes de réflectivité mesurées et calculées sur une monocouche du mélange de lipides Ni-NTA-BB:DOPC (1:3) seuls et avec la protéine HupR ancrée aux lipides [Courty 2002].

¹⁵ Voir Annexe 5.

¹⁶ Aujourd'hui Département Réponse et Dynamique Cellulaires.

Ni-NTA-BB + HupR	d (nm)	ρ (e.Å ⁻³)	σ (nm)
Couche 1	1,7	0,32	0,5
Couche 2	1,5	0,39	0,5
Couche 3	8,3	0,35	0,5
Substrat	-	0,33	0,5

Tableau 6 : Modèle de l'ajustement de la courbe de réflectivité de la protéine HupR ancrée au mélange de lipides Ni-NTA-BB:DOGA [Courty 2002]. d : épaisseur, ρ : densité électronique, σ : rugosité.

Peu d'information structurale sur la protéine est gagnée avec la première modélisation dans laquelle la monocouche de protéines est considérée comme une couche de densité constante ayant l'épaisseur de la molécule. Seule l'épaisseur moyenne de 8,3 nm et la densité électronique moyenne de 0,35 e.Å⁻³ caractérisant la monocouche de protéines sont obtenues. La seconde modélisation permet de mieux révéler des parties plus ou moins denses de la couche de protéine en utilisant une série de couches fines d'épaisseur 0,75 nm. Les protéines forment une couche d'environ 7 nm d'épaisseur attenante à la monocouche de lipides, de manière cohérente avec la première modélisation. De plus, la densité électronique est élevée près de la tête polaire des lipides. Cela fournit une explication à la disparition du minimum dû à la monocouche de lipides autour du vecteur de diffusion 0,2 Å⁻¹, visible sur la Figure 24. La protéine HupR semble être divisée en deux parties d'épaisseur 3 nm et 4 nm environ. La densité électronique de la deuxième partie diminue lentement vers la densité électronique de l'eau à l'interface protéine-eau. Cette "rugosité" apparente pourrait correspondre à une monocouche de protéine inhomogène dans le plan [Courty 2002].

Une modélisation de courbes de réflectivité X de monocouches de protéines par un programme tel que *Parratt32* peut apporter dans certains cas des informations intéressantes. Par exemple, D. Gidalevitz *et al.* ont décrit le repliement à l'interface air-eau de trois protéines en utilisant un modèle à une ou deux couches [Gidalevitz 1999]. Cependant, une telle description n'a été possible que parce que l'épaisseur des monocouches étudiées était faible (inférieure à 3 nm). Le programme *RefX* de R. Ober est bien adapté à des systèmes complexes comme une monocouche de protéines ancrées à des lipides. Il permet de décrire des variations subtiles de densité électronique moyenne suivant la normale à l'interface. Cependant, si la monocouche n'est pas homogène dans le plan, la modélisation des courbes de réflectivité spéculaire peut s'avérer très délicate voire impossible. On atteint ici une limite de la méthode. Dans ce travail, l'utilisation du programme *Parratt32* sera privilégiée pour la description des monocouches de lipides seuls, et le programme *RefX* pour l'analyse des couches lipides+protéines.

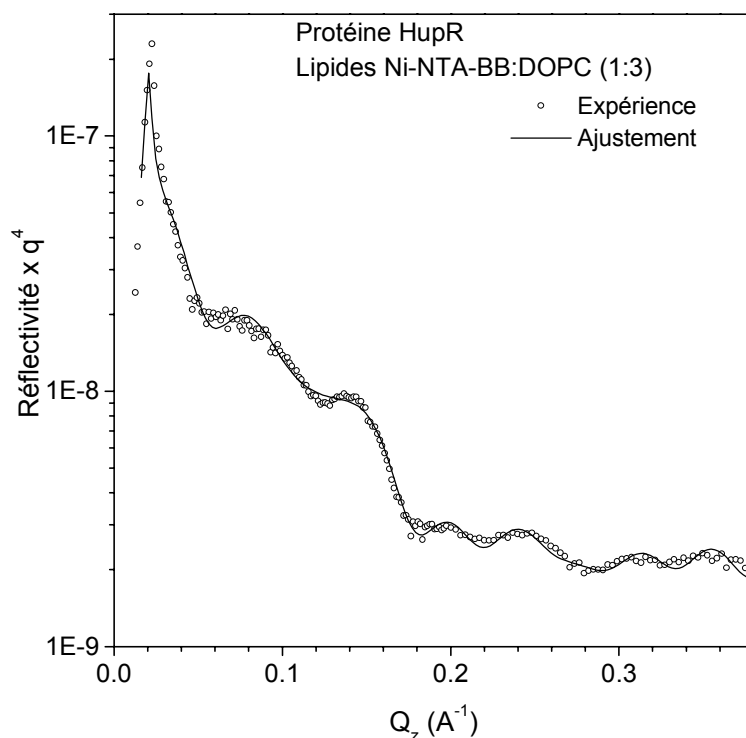


Figure 25 : Courbes de réflectivité mesurée et calculée sur une monocouche de protéine HupR ancrée au mélange de lipides Ni-NTA-BB:DOPC (1:3). L'ajustement a été réalisé avec le programme *RefX*.

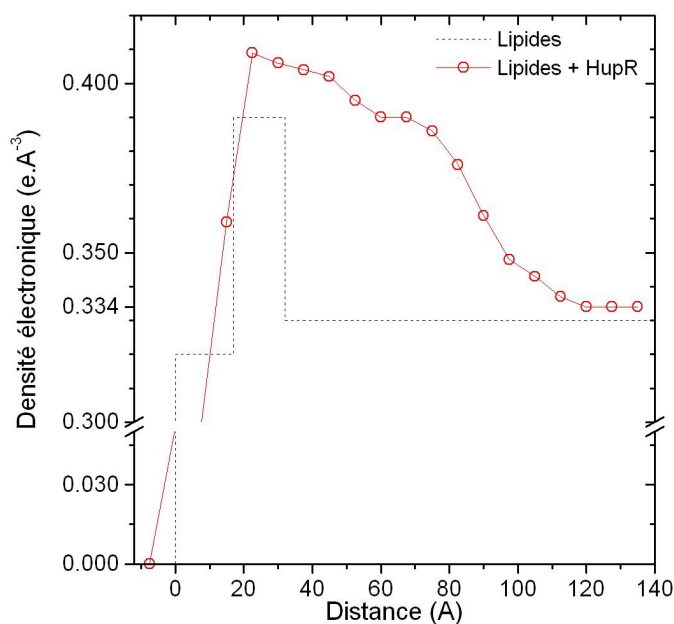


Figure 26 : Profils de densité électronique de la monocouche du mélange de lipides Ni-NTA-BB:DOPC (1:3) seuls et avec la protéine HupR, correspondant à l'ajustement présenté sur la Figure 25.

III.3.1.3 Caractéristiques techniques des montages expérimentaux

Comme nous l'avons dit précédemment, la réflectivité est une mesure de l'intensité réfléchiée par une surface en fonction de l'angle d'incidence du rayonnement. Or, la surface de l'eau sur laquelle nous déposons nos échantillons est

inévitavelmente horizontale. C'est donc le faisceau qu'il faut incliner par rapport à la surface pour faire varier l'angle d'incidence. Cela est très simple avec un générateur de rayons X mobile monté sur un goniomètre. Cependant, nous avons essentiellement travaillé avec le rayonnement synchrotron de l'ESRF (Grenoble) comme source de rayons X. L'inclinaison du faisceau est dans ce cas plus complexe.

Toutes les mesures de réflectivité X présentées dans ce manuscrit ont été effectuée à l'ESRF sur la ligne de lumière ID10B (aussi appelée Troïka II, [ID10B]) avec l'aide d'Oleg Konovalov, responsable de la ligne. Un processus de mouvements de plusieurs moteurs permet l'inclinaison du faisceau par rapport à l'horizontale [Gourier 1997, Konovalov2002]. L'élément clé du dispositif est un monochromateur composé d'un cristal de germanium Ge(111) en position de Bragg (D sur la Figure 27) tournant autour d'un axe parallèle au faisceau. Ainsi, au cours de cette rotation, le cristal reste en position de Bragg et le faisceau émergent est incliné par rapport à l'horizontale et décrit un cône. Pour obtenir un faisceau incliné sur l'échantillon, trois mouvements sont effectués : (1) rotation du monochromateur D ; (2) réglage de la hauteur du goniomètre; (3) recentrage horizontal du goniomètre par rotation autour de l'axe du faisceau émergent. Pour accomplir ces deux derniers mouvements, l'échantillon est fixé au centre d'un goniomètre à huit axes monté sur coussin d'air. Cet ensemble de mouvements assez simples a priori nécessite plusieurs moteurs et de nombreuses heures d'ajustement en raison de la très haute collimation du faisceau synchrotron monochromatique.

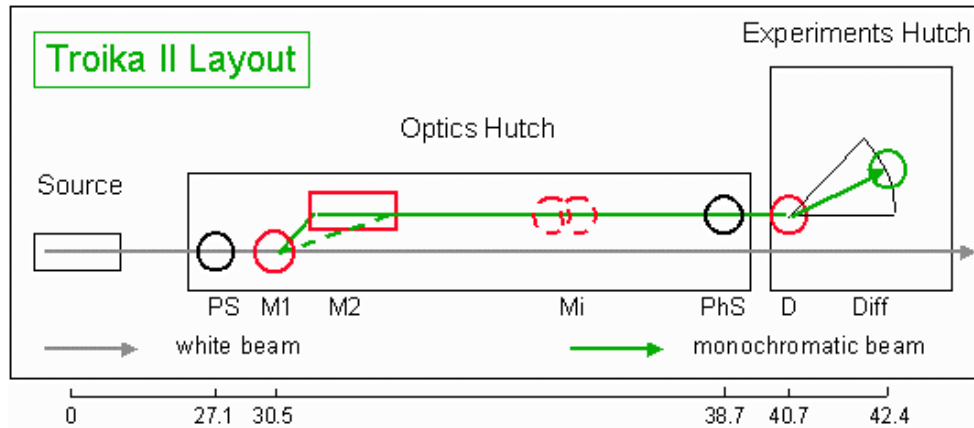


Figure 27 : Schéma montrant le dispositif expérimental de la ligne de lumière Troïka B (issu de [ID10B]) : PS fentes primaires, M1, M2 monochromateurs (diamant (111)), le premier laisse passer une partie du faisceau en direction de Troïka I (65% du faisceau à 9 keV), Mi double miroir (absorbe les harmoniques d'ordres supérieurs), PhS obturateur, D cristal déflecteur, Diff diffractomètre. Distance de la source en mètre. Le système est sous vide jusqu'à la "cabane" expérimentale ("Experiments Hutch").

La taille du faisceau est ajustée par des fentes placées juste avant l'échantillon : il est très fin verticalement (ouverture $S0=100\text{ }\mu\text{m}$) et large horizontalement pour avoir un maximum d'intensité (1 mm). L'empreinte du faisceau sur l'échantillon varie avec l'angle d'incidence selon l'équation $e=S0/\sin(\alpha)$, où e est l'empreinte du faisceau, α l'angle d'incidence et $S0$ l'ouverture verticale de la fente d'entrée. Il en résulte une baisse d'intensité à très petits angles lorsque cette empreinte est plus longue que l'échantillon. Nous avons choisi la taille de la cuve

échantillon de manière à ce que l'empreinte du faisceau soit plus petite que la cuve pour la taille de fente verticale utilisée en-dessous de l'angle critique de réflexion totale sur l'eau (voir Tableau 7). La cuve mesure 80 mm dans la direction du faisceau, ce qui constitue une surface horizontale d'eau d'environ 60 mm à cause des ménisques sur les bords de cuve. L'empreinte est donc plus petite que la cuve dès $0,095^\circ$.

Référence ESRF de l'expérience	Energie (keV)	Longueur d'onde λ (Å)	Angle critique ($^\circ$)	Profondeur de pénétration de l'aluminium (μm)
SC-694	8,95	1,3853	$0,137^\circ = 4,80 \text{ mrad}$	107,904
SC-828	8,07	1,5365	$0,152^\circ = 2,66 \text{ mrad}$	79,658
SC-987	8,00	1,5500	$0,154^\circ = 2,68 \text{ mrad}$	77,627

Tableau 7 : Données relatives aux trois série d'expériences faites à l'ESRF.

L'intensité réfléchie est recueillie par un détecteur linéaire sensible à la position (PSD) (PSD-50, Braun, Garching, Allemagne) parallèle au plan d'incidence. Un second détecteur (le moniteur) est placé avant l'échantillon et reçoit les rayons diffusés par une feuille mince de Kapton traversée par les rayons. L'intensité lue sur le moniteur est donc proportionnelle à l'intensité incidente. Les données (positions des moteurs et intensités des détecteurs) sont enregistrées par le programme de contrôle SPEC (Certified Scientific Software). Comme l'intensité mesurée chute très vite avec l'angle d'incidence, un jeu d'absorbeurs en aluminium d'épaisseurs variables est placé entre le moniteur et l'échantillon pour rester dans la zone linéaire du détecteur. Une série de mesures angulaires est réalisée en diminuant l'épaisseur d'aluminium quand l'angle augmente.

Le traitement des données de réflectivité préalable à leur analyse est effectué grâce à une série de petits programmes ou macros que nous avons écrits et exécutés à l'aide du logiciel Igor (Wavemetrics, Inc.). Le signal mesuré par le PSD est divisé par l'intensité lue sur le moniteur en chaque point. Il est ajusté par une gaussienne comme le montre la Figure 28. Le bruit de fond recueilli sur les canaux éloignés du signal est soustrait et l'intensité réfléchie dans la direction spéculaire est égale à l'aire sous la gaussienne. Le traitement préliminaire des données consiste à rassembler les mesures effectuées avec des épaisseurs différentes d'absorbeur en aluminium pour obtenir une courbe de réflectivité complète, comme l'indique la Figure 29. Le coefficient d'absorption de l'aluminium est connu en fonction de la longueur d'onde [CXRO] et l'épaisseur est donnée par le fabricant. Cependant, pour chaque partie de la courbe, il est possible que le détecteur soit saturé à petits angles et que le bruit de fond soit incorrectement soustrait à grands angles. Cette étape de traitement des données est donc délicate. La réflectivité est le rapport entre l'intensité réfléchie et incidente c'est-à-dire le faisceau direct. En pratique, l'intensité réfléchie est divisée par le moniteur puis multipliée par le coefficient de proportionnalité entre le moniteur et le faisceau direct.

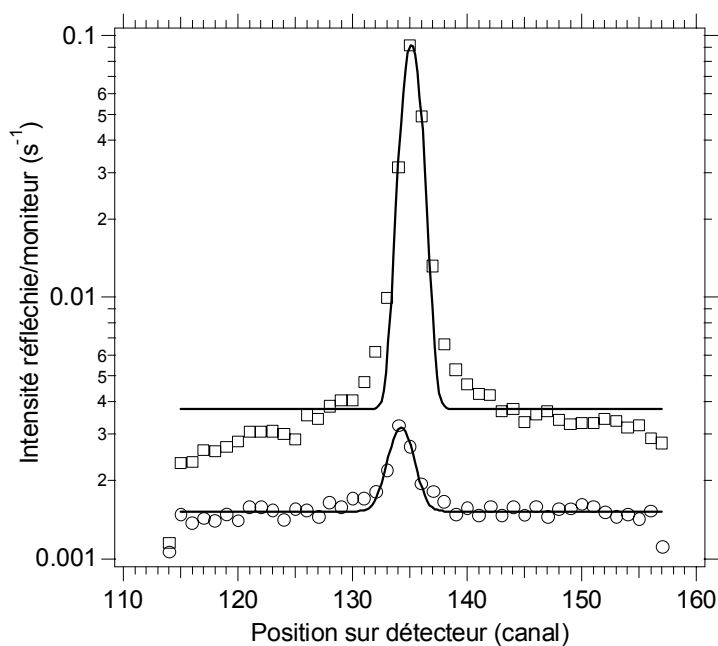


Figure 28 : Deux exemples du signal mesuré par le détecteur PSD en échelle logarithmique pour un angle d'incidence faible (\circ) ou grand (\square). Le faisceau réfléchi est ajusté par une gaussienne le long de canaux du détecteur dont la base détermine le bruit de fond.

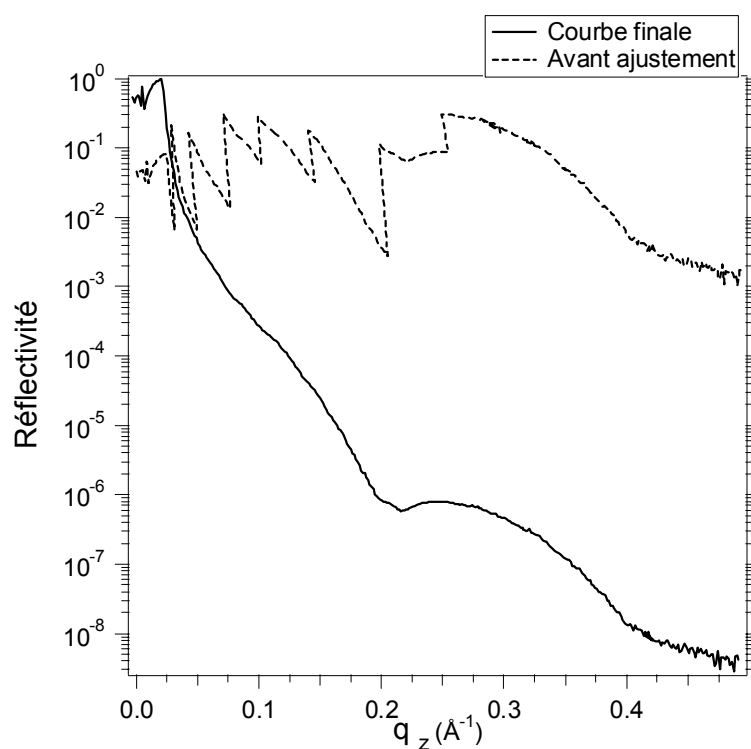


Figure 29 : Exemple d'une courbe de réflectivité X brute avant traitement des données, puis de la courbe de réflectivité reconstituée.

La précision de l'angle d'incidence dépend de l'alignement de la cuve avec le faisceau horizontal. La hauteur de l'échantillon doit donc être connue très précisément. Un réglage est fait au début de chaque mesure de réflectivité et deux fois au milieu de la courbe. De plus, un dispositif régule le niveau dans la cuve

avec une précision de 10 μm en injectant de l'eau pure au cours du temps pour contrer l'évaporation [LevelOmatic, Nanofilm Technologie GmbH].

Les protéines sont sensibles aux radiations et particulièrement aux fortes doses de rayons X [Lenne 1998, Weik 2000]. Pour limiter la dégradation des protéines et des lipides par les rayons X au cours de la mesure, la cuve échantillon est translatée latéralement aux grandes incidences lorsque les atténuateurs en aluminium sont minces ou retirés [Konovalov 2002, Weygand 2000]. Ainsi, chaque millimètre de la couche est irradié pendant une durée d'une centaine de secondes. De plus, un obturateur est ouvert uniquement lors des mesures et fermé pendant tout mouvement supplémentaire des moteurs ou toute attente.

Enfin, la cuve contenant l'échantillon est placée dans une enceinte hermétique conçue au laboratoire (Figure 30). Cette enceinte est remplie d'hélium (saturé en eau) pour limiter la diffusion des rayons X et réduire la formation d'ozone pouvant oxyder les lipides. L'ensemble est monté sur des blocs anti-vibratoires (MOD-2, Halcyonics) pour réduire les fluctuations à la surface de l'eau. La cellule est disposée face au faisceau qui entre par une petite fenêtre en Kapton (50mm) et sort par la fenêtre opposée qui est plus large (150 mm) pour permettre les expériences de diffraction de surface. Deux cuves en Teflon sont disposées sur une platine de translation perpendiculaire à la direction du faisceau. La cuve de droite est utilisée pour l'incubation des couches de protéines. La cuve de gauche est étudiée. Au-dessus de cette couche est disposée le régulateur de niveau d'eau Level-O-Matic précédemment décrit.

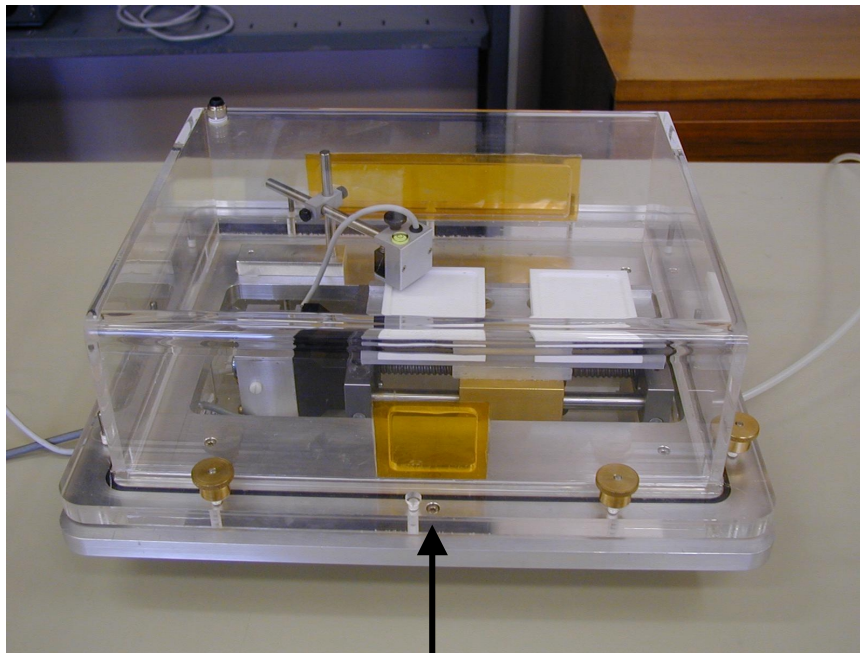


Figure 30 : Photographie de la cellule expérimentale réalisée pour les expériences de réflectivité X sur la ligne Troïka B (ESRF). Une flèche indique la direction du faisceau de rayons X incident.

III.3.2 Ellipsométrie

D'après les relations de Fresnel ou les équations plus générales obtenues par le calcul matriciel, les composantes p et s de la lumière ne se réfléchissent pas de

la même manière sur une surface. Autrement dit, la polarisation d'une onde plane électromagnétique change après réflexion. La mesure de la polarisation après réflexion de l'onde contient donc des informations sur la constante diélectrique du matériau. C'est sur ce phénomène que repose le principe de l'ellipsométrie.

Une mesure ellipsométrique consiste à mesurer la différence de réflexions des deux composantes de polarisation de la lumière avant et après réflexion sur une surface [Azzam 1977]. Cette mesure peut être faite en fonction de l'angle d'incidence, en fonction de la longueur d'onde de la lumière, ou à angle d'incidence et longueur d'onde fixés dans une mesure de cinétique d'adsorption. Cette technique est très intéressante puisqu'elle permet d'étudier et de suivre en temps réel des variations de densité à la surface de l'échantillon. C'est une technique très ancienne que I. Langmuir et V. Schaeffer ont utilisé dès les années 1930 pour déterminer l'épaisseur de couches minces organiques déposées sur une surface solide. Cette technique permet également l'étude des interactions entre les molécules formant une monocouche et des molécules en solution sans avoir besoin de les marquer par une molécule fluorescente qui pourrait interférer avec l'activité biochimique de la molécule [Elwing 1998].

III.3.2.1 Adaptation des équations générales

La relation maîtresse de l'ellipsométrie est le rapport $\rho = \frac{r_p}{r_s}$ des coefficients de réflexion pour les deux composantes de polarisation de la lumière, r_p et r_s . Deux angles ellipsométriques ψ et Δ sont définis par cette variable complexe : $\rho = \tan\psi \cdot e^{i\Delta}$. L'angle Δ est la différence des déphasages après les réflexions p et s , $\Delta = \delta_p - \delta_s$. L'angle ψ est défini par la relation $\tan(\psi)$ qui est le rapport des modules des coefficients de réflexion p et s , $\tan(\psi) = \frac{|r_p|}{|r_s|}$.

Dans le visible, l'indice de réfraction n et le coefficient d'absorption k sont habituellement préférés à la constante diélectrique complexe $\hat{\epsilon}$. Les matériaux que nous étudions n'adsorbent pas aux longueurs d'onde auxquelles nous travaillons, donc $k=0$. De plus, leur dispersion n'est pas très importante comme nous l'avons souligné dans le cas de l'eau¹⁷. Nous caractérisons donc un matériau uniquement par son indice de réfraction ou indice optique. L'indice optique d'un substrat composé d'une solution tampon aqueuse est très proche de celui de l'eau qui vaut 1,333. Des valeurs typiques des indices de réfraction sont de 1,5 pour les lipides et de 1,42 pour les protéines.

Les variations des modules carrés R_p et R_s des coefficients de réflexions r_p et r_s sont représentés en fonction de l'angle d'incidence sur la Figure 31 pour un système à deux phases, c'est-à-dire par exemple une interface air-eau.

¹⁷ Voir Annexe 3.

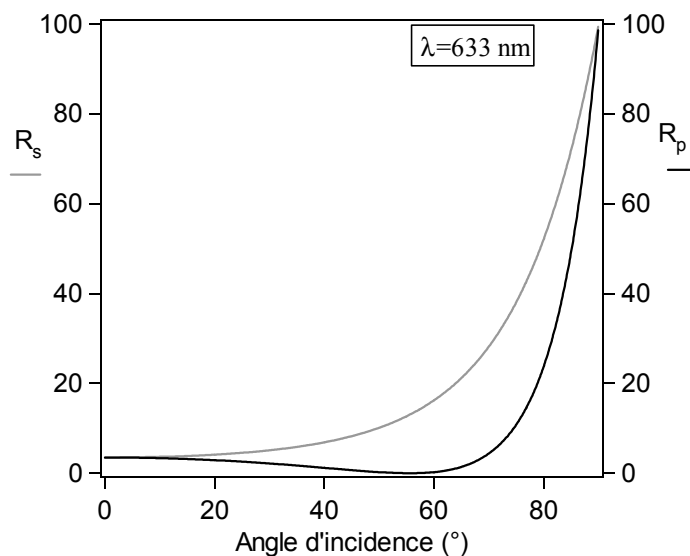


Figure 31 : Variation de R_p et R_s en fonction de l'angle d'incidence θ pour une réflexion sur l'eau.

Le coefficient R_p s'annule à l'angle de Brewster θ_B défini par $\tan \theta_B = \frac{n_2}{n_1}$ où n_1

et n_2 sont les indices de réfraction des deux couches (ici $n_1=1$ pour l'air et $n_2=1,33$ pour l'eau). L'indice de réfraction du substrat peut donc être déterminé expérimentalement par la mesure de l'angle θ_B . Les variations correspondantes des angles ellipsométriques ψ et Δ sont indiquées sur la Figure 32. A l'angle de Brewster, ψ s'annule et Δ subit un déphasage de π lorsque l'angle d'incidence augmente. Les calculs ont été effectués par notre programme Fresnel (voir III.2, p. 39).

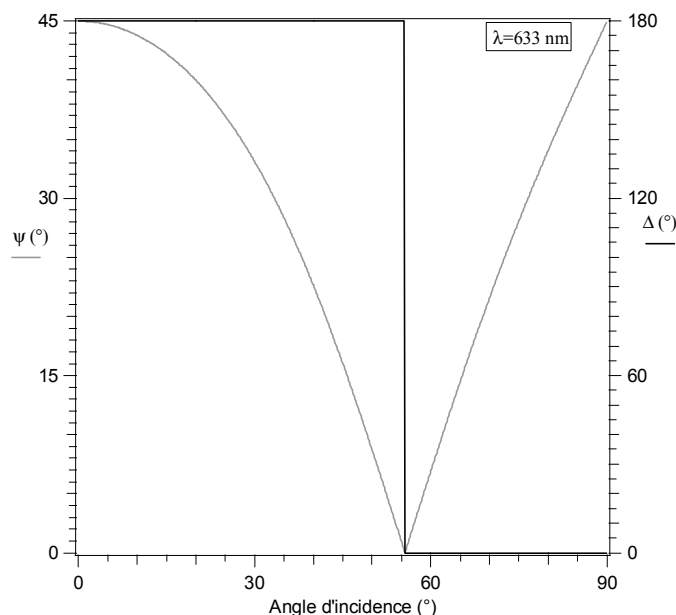


Figure 32 : Variation de ψ et Δ en fonction de l'angle d'incidence θ pour une réflexion sur l'eau (correspondant à la Figure 31).

III.3.2.2 Cas d'une couche mince sur un substrat

Dans le cas d'une couche mince sur un substrat semi-infini (c'est-à-dire un système à trois phases), il y a une réflexion résiduelle de la composante p à l'incidence de Brewster. Cela se traduit par une modification des variations $\psi(\theta)$ et $\Delta(\theta)$: ψ n'est plus nul à l'angle de Brewster et le déphasage Δ ne passe plus abruptement de π à 0 lorsque l'angle d'incidence augmente mais de manière continue. Plus la couche sera épaisse et/ou dense, plus ces caractéristiques seront marquées.

Pour un angle d'incidence donné, les variations des angles ellipsométriques sont linéaires avec l'augmentation de l'épaisseur jusqu'à une certaine limite. Azzam et Bashara ont explicité les équations linéaires reliant ψ et Δ à l'épaisseur d'un film, les indices du substrat, de la couche et de la phase ambiante étant connus [Azzam 1977]. Cependant, les auteurs insistent sur l'étroit domaine de validité de cette approximation. Dans ce domaine de validité, de très faibles variations d'épaisseur peuvent être détectées, jusqu'au centième de nanomètre [Tompkins 1993].

L'approximation de Drude permet de calculer l'épaisseur d'une couche lorsque son indice de réfraction est connu, en faisant l'hypothèse que les variations de Δ sont proportionnelles à l'épaisseur [Drude 1891]. Plus tard, A. Saxena a dérivé une approximation au premier ordre des équations de Fresnel appliquées à un système à deux interfaces. [Saxena 1965]. Il a obtenu une relation linéaire entre la variation de Δ ou de ψ et l'épaisseur du film qui permet ainsi de déterminer l'épaisseur d'un film dès lors que l'on connaît son indice de réfraction. Ces deux approximations sont valables dans le cas des couches minces : en ce qui concerne les variations de l'angle Δ , l'approximation de Saxena donne une estimation correcte de l'épaisseur du film jusqu'à 4 nm et l'approximation de Drude jusqu'à 2 nm [Saxena 1965]. Elles s'appliquent très bien à l'étude de couches d'oxydes ou d'atomes adsorbés sur une surface [Tompkins 1993], ainsi qu'à l'étude de couches organiques minces, comme les monocouches lipidiques. La mesure des variations $\delta\Delta$ lors de la formation d'une couche mince est par exemple sensible à des changements de phase opérés au sein de la couche [Ducharme 1990]. Elle peut également permettre de déterminer l'épaisseur d'une couche organique mince dont l'indice de réfraction est connu [Gambut 1996]. Cependant, les couches de protéines greffées sur des lipides sont trop épaisses pour satisfaire aux conditions de l'approximation de Drude.

La Figure 33 indique les variations des angles ellipsométriques calculées à l'aide de notre programme *Fresnel* (voir III.2, p. 39) en fonction de l'épaisseur d'une couche mince : $\delta\psi = \psi_{\text{couche}} - \psi_{\text{eau}}$ et $\delta\Delta = \Delta_{\text{couche}} - \Delta_{\text{eau}}$. Paramètres du modèle : indice de réfraction 1,42, déposée sur un substrat d'eau ($n=1,33$) dans l'air, pour un angle d'incidence de $52,5^\circ$ et à une longueur d'onde de 459 nm.

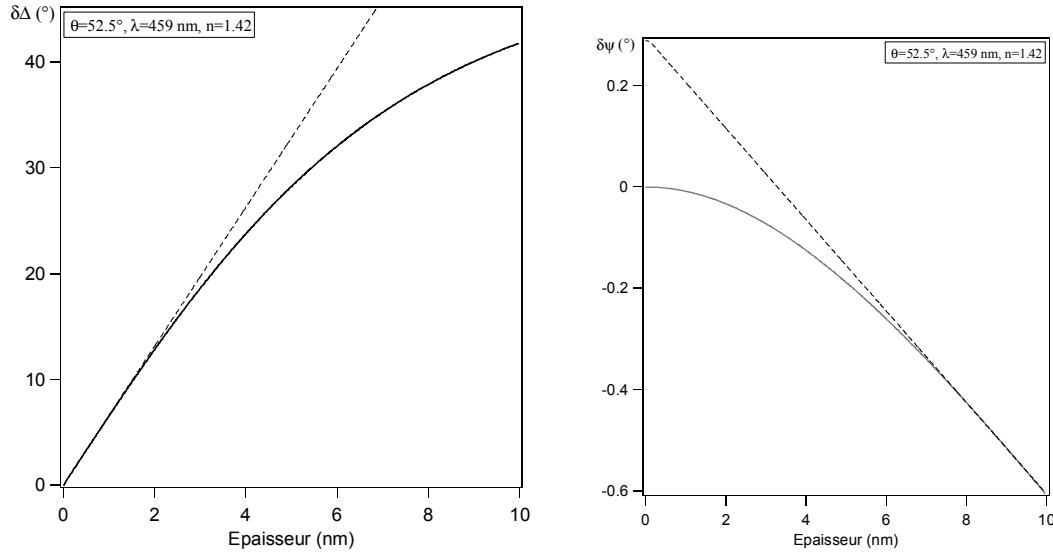


Figure 33 : Variations des angles ellipsométriques $\delta\Delta(52,5^\circ)$ (à gauche) et $\delta\psi(52,5^\circ)$ (à droite) en fonction de l'épaisseur d'une couche mince ($n=1,42$, $\kappa=0$) sur un substrat d'eau ($n=1,33$) dans l'air. La longueur d'onde du faisceau incident $\lambda=459\text{nm}$, angle d'incidence $52,5^\circ$.

Nous remarquons que $\delta\Delta(52,5^\circ)$ varie linéairement avec l'épaisseur de la couche jusqu'à une épaisseur de 2 nm avec une erreur inférieure à 1%. Dans la partie linéaire, le coefficient directeur de la droite $\delta\Delta$ donne le nombre de degré de Δ par nanomètre de couche : environ 7 deg/nm (pour un indice de 1,42 et à $\theta=52,5^\circ$). L'approximation d'une variation linéaire de Δ avec l'épaisseur de couche adsorbée est donc seulement vraie dans cette limite. Nous ne pouvons pas la garder pour décrire nos systèmes puisque la longueur d'une cadhérine mesurée par plusieurs techniques est d'environ 23 nm (microscopie électronique [Pertz 1998], mesure de force [Sivasankar2001b], cristallisation [Boggon 2002]). A l'inverse, ψ est presque insensible au changement de l'épaisseur jusqu'à environ 2 nm. Les variations de ψ sont linéaires avec la variation d'épaisseur à partir de 7 nm.

III.3.2.3 Variation de l'angle de Brewster en fonction de la couche déposée

Une première observation de la Figure 33 montre que, lorsque la couche déposée devient suffisamment grande, $\Delta(52,5^\circ)$ n'est plus proportionnel à l'épaisseur, mais $\psi(52,5^\circ)$ le devient. La variation de ψ en fonction de l'angle d'incidence (voir Figure 34) indique un déplacement complet de la courbe vers les grands angles. A l'angle choisi ($52,5^\circ$), la courbe de $\psi(\theta)$ atteint sa partie linéaire et dès lors ψ est proportionnel à l'épaisseur de la couche.

Nous observons ainsi un déplacement de l'angle de Brewster sur les variations angulaires de ψ et Δ en fonction d'une couche mince soit d'indice ou d'épaisseur donnée. La Figure 34 indique ces variations pour une couche d'indice 1,42 qui croît de 1 à 20 nm. L'angle de Brewster s'est déplacé de $53,06^\circ$ (pour l'eau) à $53,55^\circ$. Cet angle correspondrait pour un système à une interface à un indice effectif de 1,354 si l'on applique la définition de l'angle de Brewster.

De la même manière, l'ajout d'une couche mince de 5 nm et d'indice variable sur l'eau implique une variation de l'angle de Brewster (Figure 35). Ce décalage est néanmoins de plus faible importance et concerne des indices légèrement supérieurs aux valeurs admises pour nos systèmes.

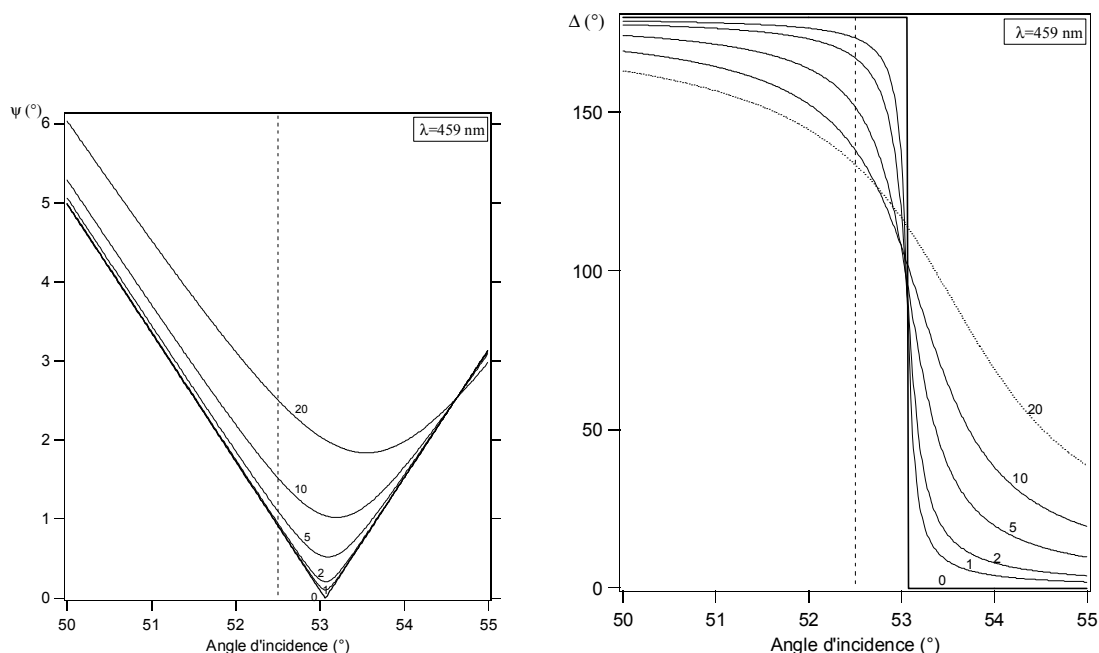


Figure 34 : Variations angulaires de ψ et Δ en fonction d'une couche mince d'indice ($n=1,42$, $\kappa=0$) sur l'eau ($n=1,33$) pour différentes épaisseurs : 1, 2, 5, 10, 20 nm.

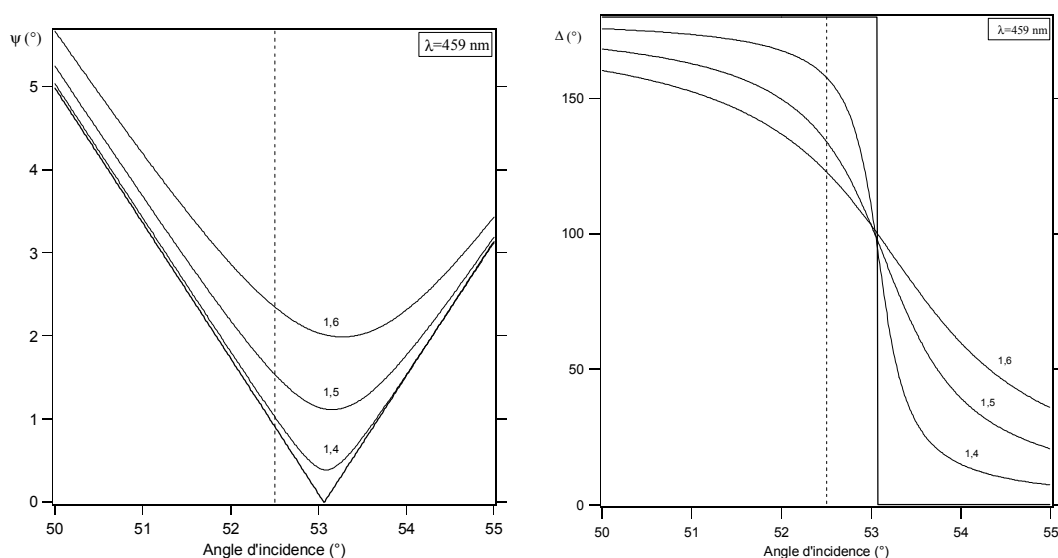


Figure 35 : Variations angulaires de ψ et Δ en fonction d'une couche mince d'épaisseur fixe 5 nm sur l'eau ($n=1,33$) pour différentes valeurs d'indice : 1,4; 1,5; 1,6.

III.3.2.4 Exemple de la protéine HupR

Le signal ellipsométrique mesuré sur une monocouche de la protéine HupR ancrée à une monocouche de lipides ligands Ni-NTA-BB:DOPC (1:3) est représentée sur la Figure 36. Le protocole de l'expérience est le même que celui décrit

précédemment¹⁸. Des courbes ellipsométriques angulaires successives ont été enregistrées pendant cette expérience. Une première courbe sur les lipides seuls est représentée sur la Figure 37, ainsi que deux courbes montrant l'adsorption de la protéine après 1 heure, puis 17 heures d'incubation. Nous verrons dans les paragraphes suivants comment analyser ces courbes.

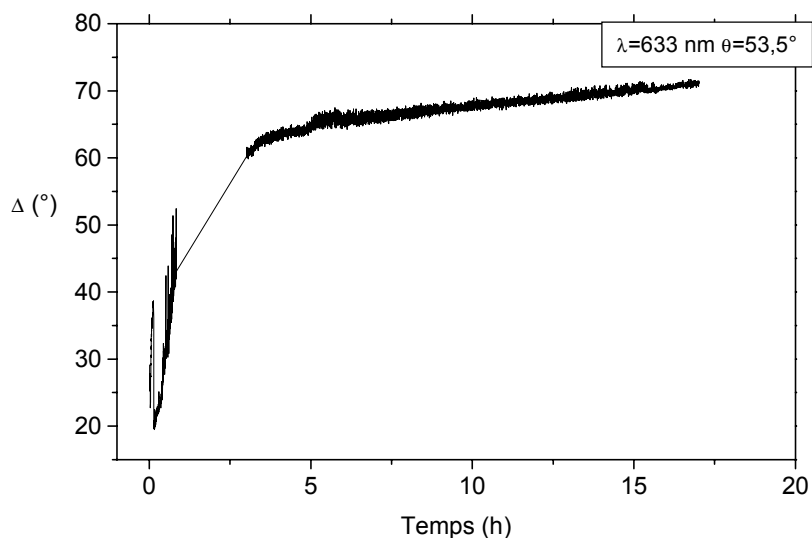


Figure 36 : Mesure de l'angle ellipsométrique Δ sur une monocouche de la protéine HupR ancrée à une monocouche du mélange de lipides Ni-NTA-BB:DOPC (1:3).

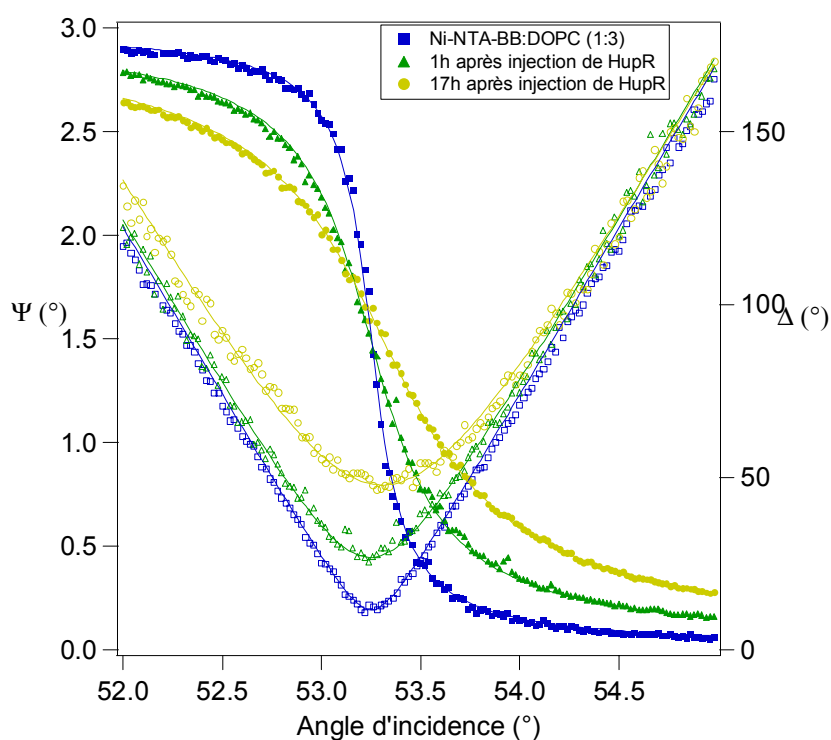


Figure 37 : Suivi des variations des angles ellipsométriques ψ et Δ en fonction de l'angle d'incidence : monocouche de lipides Ni-NTA-BB:DOPC (1:3), puis 1 heure après l'injection de la protéine HupR, enfin 17 heures après l'injection de la protéine HupR. L'angle ψ est représenté en symboles vides et Δ en symboles pleins.

¹⁸ Voir *Un cas réel : la protéine HupR ancrée à une monocouche de lipides*, p. 45.

III.3.2.5 Modélisations de courbes ellipsométriques

Les angles ellipsométriques ψ et Δ sont enregistrés en fonction du temps et à angle d'incidence fixe pendant toute la durée de l'incubation des protéines. Ces courbes de mesure cinétique permettent d'évaluer le temps d'incubation nécessaire à la formation de la monocouche de protéine à l'interface entre lipides et eau, déterminé à partir de la stabilisation des angles ellipsométriques. Toutefois, les sensibilités de ψ et de Δ ne sont pas les mêmes à différents angles d'incidence. De plus, les variations des angles ellipsométriques ψ et Δ ne sont pas linéaires avec les variations de la quantité de matière adsorbée à l'interface air-eau. Il est par conséquent nécessaire d'effectuer des mesures ellipsométriques angulaires à intervalles réguliers afin d'évaluer la quantité de masse adsorbée à la surface de l'eau.

Le système constitué par les protéines liées à la monocouche de lipides peut être décrit en première approximation par un modèle composé du substrat ou sous-phase et d'une couche de surface. Ce modèle comporte trois paramètres : l'indice de réfraction du substrat n_s et celui de la couche lipides+protéines n_l , l'épaisseur de la couche d . Les courbes expérimentales des variations angulaires des angles ψ et de Δ sont alors comparées aux courbes calculées par le programme *Fresnel* (voir III.2, p. 39) et les paramètres qui reproduisent le mieux l'expérience sont recherchés. On obtient ainsi les paramètres (n_s, n_l, d) caractérisant le système. Cependant, cette détermination n'est pas univoque [Azzam 1977, Tompkins 1993]. L'indice de réfraction du substrat peut être fixé, puisqu'il s'agit de celui de l'eau. En revanche, seul le produit de l'épaisseur et de l'indice de réfraction de la couche est relié aux variations de ψ et Δ .

Nous avons comparé des courbes ellipsométriques théoriques calculées à partir de modèles à une ou deux couches. La Figure 38 met en évidence les différences entre les courbes obtenues. Une courbe "lipides seuls" a été calculée à partir d'un modèle à une couche ($n_{\text{lipide}}=1,45$ et $d_{\text{lipide}}=3$ nm). La courbe "protéines seules" a été également calculée à partir d'un modèle à une couche ($n_{\text{protéine}}=1,42$ et $d_{\text{protéine}}=23$ nm). Enfin, la courbe "lipides + protéines" a été calculée à partir d'un modèle à deux couches ($n_{\text{lipide}}=1,45$ et $d_{\text{lipide}}=3$ nm, $n_{\text{protéine}}=1,42$ et $d_{\text{protéine}}=20$ nm).

La prise en compte d'une couche de lipides distincte de la couche de protéine change très peu les angles ellipsométriques. De plus, les variations observées sont dans l'erreur expérimentale (15% pour ψ , 1% pour Δ , voir III.3.2.6, p. 61). Nous avons donc choisi de modéliser nos systèmes avec une seule couche afin de réduire le nombre de paramètres à ajuster. De plus, une telle modélisation nous permet d'utiliser l'approximation de de Feijter [de Feijter 1978] pour l'évaluation de la masse surfacique adsorbée que nous présenterons dans la section suivante.

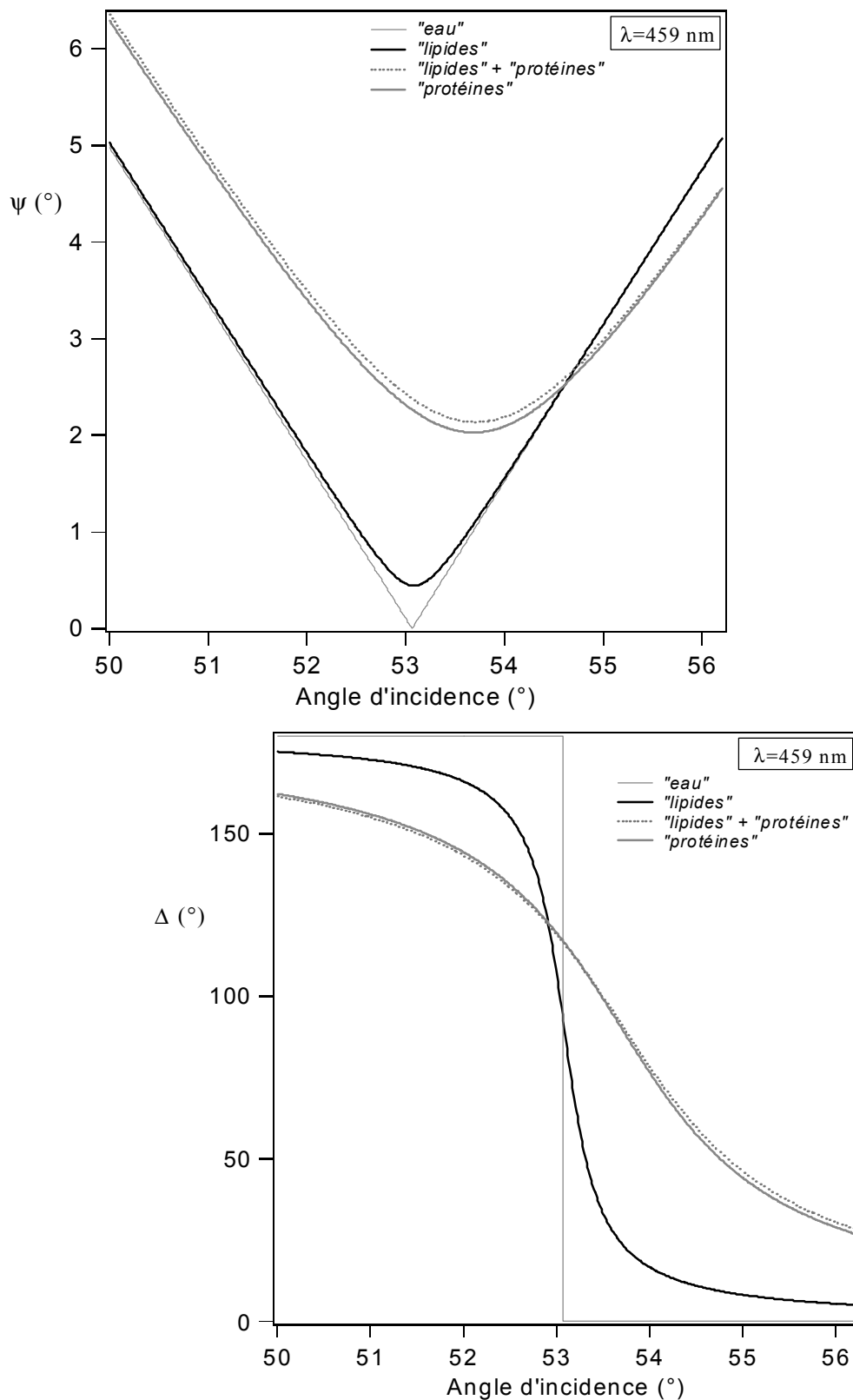


Figure 38 : Effet de la prise en compte des lipides dans le calcul de courbes ellipsométriques. Paramètres utilisés: a) un système à une couche représentant des lipides seuls ($n_{\text{lipide}}=1,45$ et $d_{\text{lipide}}=3 \text{ nm}$), b) un système à une couche représentant des protéines seules ($n_{\text{protéine}}=1,42$ et $d_{\text{protéine}}=23 \text{ nm}$), c) un système à deux couches représentant des lipides + des protéines ($n_{\text{lipide}}=1,45$ et $d_{\text{lipide}}=3 \text{ nm}$, $n_{\text{protéine}}=1,42$ et $d_{\text{protéine}}=20 \text{ nm}$). $n_{\text{eau}}=1.33$.

Ces remarques nous invitent à une grande prudence dans l'analyse des données ellipsométriques. Les variations cinétiques de ψ ou Δ lors de l'adsorption de protéine à la surface de l'eau ne peuvent donc pas être transformées directement en masse adsorbée par unité de surface, mais elles restent fortement liées à tout changement dans la couche. En conclusion, des mesures angulaires ou des mesures en fonction de la longueur d'onde peuvent permettre une meilleure modélisation du système étudié.

Nous mesurons néanmoins des courbes ellipsométriques en fonction du temps pour suivre l'évolution de la couche. Dans ce cas, l'angle d'incidence est choisi à environ 1° de l'angle de Brewster pour que les variations de Δ soient suffisamment grandes. Lors des mesures cinétiques, nous définissons la "saturation" de la couche comme l'instant où l'évolution des angles Δ et ψ est stable dans le temps. Nous considérons que la surface est alors en équilibre avec la sous-phase et que la couche a atteint sa densité surfacique maximale. Notons que dans le cas de la cristallisation bi-dimensionnelle de nombreux réarrangements se produisent après cette saturation [Lenne 1998].

III.3.2.6 Mesure des angles ellipsométriques ψ et Δ

Il existe plusieurs techniques de mesures ellipsométriques [Azzam 1977], [Tompkins 1993]. La plus simple utilise un polariseur ou un analyseur tournant. Une onde plane électromagnétique polarisée linéairement est envoyée sur l'échantillon. Après réflexion, la lumière est polarisée elliptiquement. Une lame quart d'onde est positionnée de manière à rendre cette polarisation linéaire et un deuxième polariseur mesure la rotation de polarisation. En général, cette mesure est faite par extinction du faisceau, c'est-à-dire que l'on mesure la direction perpendiculaire à la polarisation (il est plus facile de mesurer une intensité nulle que maximale). Les angles des polariseurs sont reliés de manière simple aux angles ellipsométriques ψ et Δ [Azzam 1977]. Cette technique est très simple à mettre en œuvre mais la mesure n'est pas très rapide [Rossow 1996].

L'ellipsomètre que nous avons utilisé est plus complexe mais beaucoup plus rapide [Acher 1989]. Il fait partie d'une autre classe d'ellipsomètre, les ellipsomètres à modulation de phase. La polarisation de l'onde est modulée avant l'échantillon et les changements d'intensité induits par la réflexion sont mesurés. L'intensité détectée est liée à la polarisation du signal, elle-même reliée aux angles ellipsométriques ψ et Δ [Rossow 1996, Fukazawa 1993, Jellison 1993].

Notre ellipsomètre est un ellipsomètre spectroscopique à modulation de phase UVISEL de Jobin-Yvon (Instruments SA) [Jobin-Yvon 1995, Stchakovsky 1991, Acher 1989]. Les éléments du dispositif sont représentés sur la Figure 39. La lumière blanche provenant d'une lampe à arc Xénon (125 W) est guidée par une fibre optique vers un polariseur qui la polarise linéairement à 45° par rapport à l'axe du modulateur photoélastique. Le modulateur photoélastique dépolarise légèrement le faisceau en ajoutant une composante perpendiculaire de polarisation à une fréquence de 50 kHz. Par conséquent, la polarisation de l'onde incidente sur l'échantillon varie de linéaire à elliptique à la fréquence du modulateur. Après réflexion, la lumière change de polarisation car les deux composantes

p et s du faisceau ne sont pas réfléchis de la même manière par l'échantillon. Le faisceau passe par un deuxième polariseur aligné avec le premier, puis est recueilli par une fibre optique qui le conduit à un monochromateur qui permet de sélectionner la longueur d'onde. L'intensité détectée par un photomultiplicateur varie donc à la fréquence de la modulation.

La modulation est effectuée par modulateur photoélastique composé d'un bloc de verre de silice couplé à un quartz piézoélectrique [Jobin-Yvon 1995]. Le cristal est activé par une variation de tension sinusoïdale de fréquence 50 kHz, ce qui génère une biréfringence du verre. La polarisation de l'onde incidente est modulée à la même fréquence. Il en résulte un déphasage δ entre les deux composantes de la polarisation qui peut s'écrire $\delta(t) = a \sin(\omega t)$, où ω est la fréquence angulaire ($\omega = 2\pi \cdot 50 \text{ kHz}$) et a une fonction simple de la tension appliquée sur le cristal et de la longueur d'onde. Le modulateur est maintenu à une température de $30 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ afin d'assurer la stabilité de la modulation.

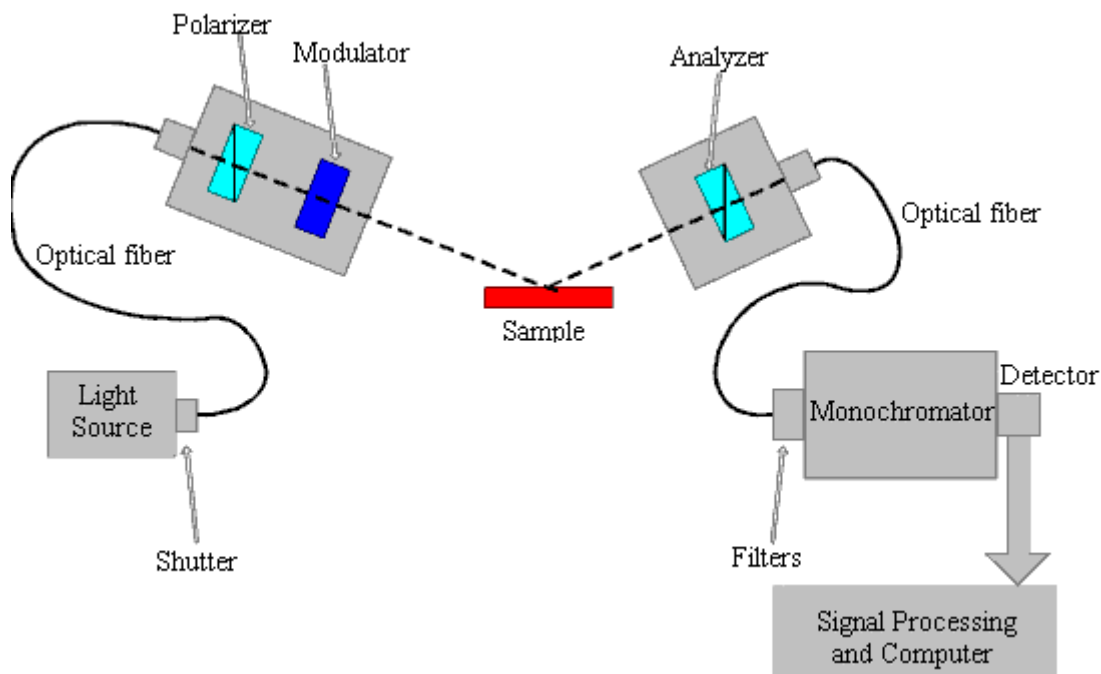


Figure 39 : Schéma de l'ellipsomètre spectroscopique à modulation de phase UVISEL de Jobin-Yvon (Instruments SA).

L'ellipsomètre est monté sur un goniomètre qui permet de régler l'angle d'incidence du faisceau et d'effectuer des mesures à angle variable. De plus, l'utilisation de la lumière blanche permet de faire des mesures à longueur d'onde variable de l'infrarouge à l'ultraviolet (200-800 nm). L'ellipsomètre est piloté par ordinateur avec le logiciel ELLI40 (Jobin-Yvon Instrument S.A.) qui calcule les angles ellipsométriques en temps réel. Lors de nos expériences, la mesure de ψ et de Δ est moyennée pendant 3 à 10 secondes et les angles Δ et ψ moyens sont enregistrés en fonction du temps pendant toute la durée de l'incubation des protéines.

La cuve échantillon est cylindrique, en Teflon, de volume de 7,5 ml (2 mm de hauteur et 35 mm de diamètre). Elle est placée dans une enceinte en plexiglas fermée pour limiter l'évaporation d'eau. Sur le chemin du faisceau, le couvercle

de la cellule est fermé par deux lamelles de microscope perpendiculaires à la direction du faisceau à l'angle de Brewster de l'eau afin de perturber le moins possible la polarisation et l'intensité du faisceau lors des mesures angulaires.

Le signal est mesuré après réflexion sur l'échantillon et passage par l'analyseur. Il est digitalisé par un convertisseur analogique-digital et un processeur calcule sa transformée de Fourier discrète afin d'obtenir la composante continue et les harmoniques de la fréquence de modulation. Seuls les signaux à la fréquence fondamentale et à la seconde harmonique sont pris en compte dans l'analyse. L'intensité mesurée s'écrit [Acher 1989] :

$$I(t) = I_0 + I_s \sin(\delta(t)) + I_c \cos(\delta(t))$$

où $\delta(t)$ est le déphasage introduit par le modulateur et I_s et I_c sont des fonctions des angles ellipsométriques ψ et Δ .

Si l'on développe les fonctions $\sin(\delta(t))$ et $\cos(\delta(t))$ à partir des fonctions de Bessel, l'intensité peut être décrite par l'équation [Azzam 1977], [Rossow 1996] :

$$I(t) = I_0(\alpha + J_0(a) + 2\beta J_1(a) \cdot \sin(\omega t) + 2\gamma J_2(a) \cdot \cos(2\omega t))$$

où les fonctions α , β et γ sont des fonctions des angles ellipsométriques ψ et Δ , J_1 et J_2 les fonctions de Bessel de premier et deuxième ordre.

Dans la configuration employée, le polariseur et l'analyseur faisaient un angle de $+45^\circ$ par rapport au plan d'incidence et le modulateur un angle de 0° (appelée conventionnellement configuration II). Les valeurs des fonctions α , β et γ sont dans ce cas [Acher 1989, Rossow 1996] :

$$\alpha=1, \quad \beta = \sin(2\psi)\sin(\Delta) \quad \text{et} \quad \gamma = \sin(2\psi)\cos(\Delta).$$

La modulation a est fixée telle que $J_0(a) = 0$, ce qui implique $J_1(a) = 1,04$ et $J_2(a) = 0,86$ et correspond à $a = 137,8^\circ$ [Acher 1989]. L'intensité s'écrit alors :

$$I(t) = I_0 + I_1 \sin(\omega t) + I_2 \cos(2\omega t),$$

avec les composantes I_1 et I_2 :

$$I_1 = 2I_0 \cdot J_1(a) \cdot \sin(2\psi) \cdot \sin(\Delta)$$

$$I_2 = 2I_0 \cdot J_2(a) \cdot \sin(2\psi) \cdot \cos(\Delta).$$

La mesure des variations temporelles de l'intensité à la fréquence de modulation permet donc d'obtenir, dans cette configuration, les valeurs de $\sin(2\psi)$ et de $\tan(\Delta)$ en fonction du temps et d'en déduire les angles ellipsométriques ψ à π près et $\Delta \pm \pi$ à 2π près.

Les erreurs sur la mesure des angles ψ et Δ peuvent être déterminées à partir des incertitudes sur la position et la précision des pièces optiques (polariseur, modulateur et analyseur) [Modine 1983]. Les auteurs calculent la précision atteignable dans le cas de la mesure des angles ψ et Δ par un ellipsomètre à modulation de phase sur un échantillon de silicium à un dixième de degré. M. Stchakovsky donne une erreur moyenne sur les mesures des angles ellipsométriques par l'ellipsomètre UVISEL de 1,7% sur ψ et 0,2% sur Δ pour un échantillon de silicium [Stchakovsky 1991]. Sur une mesure de cinétique, effectuée à angle

fixe sur un substrat d'eau, l'erreur moyenne faite sur la détermination de ψ est de 15%; sur Δ , l'erreur est de 1%.

III.4 Analyse des données expérimentales

III.4.1 Réflectivité des rayons X

Une mesure de réflectivité X conduit à une modélisation de la densité électronique des couches en électrons par unité de volume. Cependant il est courant d'exprimer les résultats de mesures ellipsométriques en masse par unité de surface. Pour pouvoir comparer les résultats obtenus par ces deux techniques, il faut donc "passer des électrons aux grammes", c'est-à-dire évaluer à quelle augmentation de masse réelle correspond la présence d'un électron supplémentaire dans le profil de densité électronique.

III.4.1.1 Relation densité électronique / densité massique de protéine

La relation entre la densité massique et la densité électronique s'écrit :

$$\rho_m (\text{g.cm}^{-3}) = \frac{M_P}{n_e \cdot N_A} \rho_e (\text{e.Å}^{-3}),$$

où M_P est la masse molaire de la protéine, n_e son nombre total d'électrons et N_A le nombre d'Avogadro. Cette relation devient après simplification :

$$\rho_m (\text{g.cm}^{-3}) = \frac{M_P}{n_e} \cdot \frac{10}{6,023} \rho_e (\text{e.Å}^{-3}).$$

Notons $R_{em} = \frac{M_P}{n_e} \cdot \frac{10}{6,023}$. Nous exprimerons le rapport R_{em} en $10^{-24} \cdot \text{g.e}^{-1}$.

La masse molaire et le nombre d'électrons de C-cadhérine est obtenue facilement à partir de sa séquence en acides aminés. La séquence publiée dans PDB ([PDB], code d'accès 1L3W) de la C-EC1-5 a une masse molaire $M_P=63\,842,5$ Da et compte $n_e=34\,085$, en tenant compte des 12 ions Ca^{2+} , de 38 molécules d'eau structurale et de 15 sucre (N-acetyl-D-glucosamine), ainsi que de plusieurs atomes absents dans la structure déterminée. Le rapport R_{em} vaut donc pour la C-cadhérine:

$$R_{em} = 3,11 \times 10^{-24} \text{ g.e}^{-1}.$$

La séquence de la VE-cadhérine VE-EC1-4 [ProtParam] correspond à une masse de 48 715,6 Da et 26 132 électrons, ce qui donne le même rapport R_{em} . La VE-cadhérine VE-EC1-4 est composée de quatre domaines extracellulaire seulement, alors que la C-cadhérine comprend les cinq domaines; mais la masse de la VE-cadhérine représente 3/4 de celle de la C-cadhérine, et non pas 4/5. Cela est dû à la présence sur la C-cadhérine des sucres, absents sur la VE cadhérine. Pour les lipides, le même calcul montre que le rapport densité électronique - densité massique est conservé pour les lipides utilisés, $R_{em}=3,0 \cdot 10^{-24} \cdot \text{g.e}^{-1}$. La densité électronique de l'eau est $0,334 \text{ e/Å}^{-3}$, par conséquent $R_{em}=2,99 \cdot 10^{-24} \cdot \text{g.e}^{-1}$.

III.4.1.2 Densité électronique moyenne des cadhérines

Pour évaluer la densité électronique moyenne de la protéine, il faut connaître son volume. La structure de la C-cadhérine ayant été résolue, il est possible d'en calculer le volume. Pour cela, nous avons employé un programme du projet CCP4 [CCP4 1971] qui calcule un volume autour des atomes de la protéine en utilisant des polyèdres de Voronoi¹⁹. Le programme déplace fictivement autour des positions des atomes une sphère de taille choisie, représentant usuellement une molécule d'eau de rayon 1,4 Å. Le volume formé par les polyèdres correspond donc au volume propre des atomes plus celui où la molécule d'eau ne peut pas être intercalée. Le volume de la structure de la C-cadhérine est de 77788 Å³. En tenant compte de la séquence des acides aminés présents dans la structure²⁰ (calcium, eau fixée et sucres compris), le rapport du nombre d'électrons par unité de masse vaut 0,534 e/Da. La densité électronique moyenne de la C-cadhérine est donc de 0,417 e.Å⁻³ et une masse volumique de 1,295 g.cm⁻³. La contribution des ions calcium Ca²⁺ dans la densité électronique est de 0,7%.

La structure de la VE-cadhérine n'ayant pas été résolue à ce jour, nous ne pouvons pas calculer son volume avec le programme CCP4. Le volume du fragment utilisé VE-EC1-4His est estimé à 67 587 Å³ par une méthode de calcul qui consiste à attribuer à chaque atome de la protéine, hors hydrogène, un volume de 19,5 Å³ [Andersson 1998]. La masse volumique du fragment de VE-cadhérine est de 1,225 g.cm⁻³ par cette méthode. Weygand *et al* [Weygand 2000, Weygand 2002] ont estimé une densité électronique de 0,412 e.Å⁻³ pour la protéine des couches S de la bactérie *Bacillus sphaericus*, en extrapolant le volume des acides aminés séparés à celui de la protéine. Il semble raisonnable de prendre la même densité électronique moyenne pour la VE-cadhérine que pour la C-cadhérine, c'est-à-dire 0,417 e.Å⁻³.

III.4.1.3 Estimation de la proportion d'eau dans une couche

Il est nécessaire de calculer la proportion volumique moyenne d'eau dans la couche pour ensuite convertir les profils de densité électronique obtenus en profils de densité massique. L'évaluation de la densité électronique moyenne des cadhérines nous permet de calculer la fraction volumique x de protéines contenue dans la monocouche :

$$x(z) = \frac{\rho_{mes}(z) - \rho_{H_2O}}{\rho_P - \rho_{H_2O}}$$

où ρ_{H_2O} la densité électronique de l'eau (0,334 e.Å⁻³) et ρ_P celle de la protéine (notre calcul). ρ_{mes} est mesurée en fonction de la profondeur z dans la couche ($z=0$)

¹⁹ Un polyèdre de Voronoi est l'équivalent de la cellule de Wigner-Seitz dans un cristal, c'est-à-dire la région des points de l'espace autour d'une particule qui sont plus proches d'elle que de ses voisines.

²⁰ Les acides aminés qui n'ont pas été vu dans la structure ne sont pas comptabilisés dans le volume, nous n'en tenons donc pas compte dans ce calcul.

à l'interface air-lipide). A partir de la proportion d'eau et de protéines dans la monocouche, la densité électronique de la protéine seule $\rho_{eP}(z)$ est calculée par la relation $\rho_{eP}(z) = x(z) \cdot \rho_P$. La densité massique $\rho_{mP}(z)$ correspondante s'obtient alors en multipliant la densité électronique de la protéine seule $\rho_{eP}(z)$ par le rapport densité électronique/densité massique R_{em} :

$$\rho_{mP}(z) [g.m^{-3}] = x(z) \cdot \rho_P \cdot R_{em},$$

$$\text{ou } \rho_{mP}(z) [g.m^{-3}] = 1,297 \cdot x(z).$$

III.4.1.4 Densité massique surfacique apparente

A partir du pourcentage d'eau dans la couche protéique et de la relation densité électronique/densité massique, une relation entre la densité électronique volumique et la densité massique surfacique d peut être calculée. Pour comparer cette valeur à la masse surfacique apparente obtenue par ellipsométrie, il faut tenir compte uniquement de la contribution de la protéine :

$$d(mg.m^{-2}) = 3,11.10^{-1} \cdot \bar{x} \cdot \rho_P \cdot h(\text{\AA}),$$

où \bar{x} est le pourcentage moyen de protéines dans la couche et h est l'épaisseur de la couche de protéine.

Une deuxième méthode d'analyse plus précise consiste simplement à calculer l'aire sous la courbe de densité massique de protéine $\rho_{mP}(z)$. Cette méthode est privilégiée car elle ne fait pas intervenir l'épaisseur de la couche de protéine, ni une valeur moyenne.

III.4.2 Ellipsométrie

III.4.2.1 Traitement des données brutes

III.4.2.2 Calcul de la masse adsorbée par l'équation de de Feijter

A partir des paramètres (n_s , n_I , d) déterminés par l'ajustement d'une courbe calculée à la courbe expérimentale, il est possible d'évaluer la masse de protéines adsorbée à la surface du substrat. Il existe plusieurs méthodes pour le calcul de la masse adsorbée. Nous utilisons l'approximation de de Feijter *et al.* [de Feijter 1978] qui exprime la quantité de masse par unité de surface Γ en fonction de l'augmentation d'indice et de l'épaisseur de la couche adsorbée.

La masse adsorbée par unité de surface Γ est calculée à partir de la différence de concentration entre la sous-phase, composée d'eau et de protéines à une concentration c_s , et la couche de même composition mais de concentration dépendant de la distance à l'interface air-eau $c_I(z)$:

$$\Gamma = \int_0^{\infty} (c_I(z) - c_s) dz.$$

Les auteurs expriment l'indice de réfraction moyen de la couche adsorbée $\langle n_I \rangle$ et son épaisseur moyenne $\langle h \rangle$ en fonction de l'indice du substrat n_s et de l'indice $n_I(z)$ de la couche qui dépend de la distance z à l'interface air-eau :

$$\langle n_I \rangle = \frac{\int_0^\infty n_I(z) \cdot (n_I(z) - n_s) dz}{\int_0^\infty (n_I(z) - n_s) dz} \quad \text{et} \quad \langle h \rangle = \frac{\int_0^\infty (n_I(z) - n_s) dz}{\langle n_I \rangle - n_s}$$

En supposant que l'indice de réfraction de la couche $n_I(z)$ est une fonction linéaire de la concentration, les auteurs en déduisent une expression de la masse adsorbée par unité de surface Γ :

$$\Gamma(\text{mg} / \text{m}^2) = \frac{\langle n_I \rangle - n_s}{\frac{dn}{dc}} \cdot \langle h \rangle (\text{\AA}) \quad \text{Équation 4}$$

où $\frac{dn}{dc}$ est l'incrément d'indice exprimé en fonction de la concentration en ml/g, et Γ est généralement exprimée en mg/m² ou en µg/cm².

L'expression de la masse adsorbée par unité de surface Γ dépend du produit de l'épaisseur de la monocouche et de la différence entre l'indice de réfraction moyen et celui du substrat. Ainsi, seul ce produit est accessible par l'analyse de la mesure ellipsométrique. Si l'on considère la formation d'une couche à la surface de l'eau, l'évolution de Γ sera linéaire avec celle de la variation $\delta\Delta$ à condition que l'indice de réfraction de la couche soit constant et que seule l'épaisseur varie [Jönsson 1985]. Dans le cas contraire, où l'épaisseur de la couche formée est constante, mais où son indice de réfraction augmente, la relation entre Γ et $\delta\Delta$ n'est pas triviale. Or, dans le cas de la formation d'une monocouche de cadhérine, les protéines sont orientées à la surface par un greffage spécifique sur les lipides. On peut donc considérer que l'épaisseur de la couche est fixée par la taille de la protéine. En revanche, l'indice de réfraction moyen de la monocouche varie à mesure que les protéines s'ancrent à la surface. Il s'ensuit que la relation entre Γ et $\delta\Delta$ n'est *a priori* pas linéaire dans notre étude.

III.4.2.3 Incrément d'indice

L'incrément d'indice $\frac{dn}{dc}$ est la variation de l'indice de réfraction d'une solution en fonction de la concentration de protéine. Sa valeur est essentielle pour l'estimation de Γ . Dans leur étude sur l'adsorption de protéines à la surface de l'eau en fonction de leur concentration en volume, de Feijter *et al.* ont montré que l'indice de réfraction de la solution est une fonction linéaire de la concentration de la protéine. Il peut-être mesuré avec un réfractomètre d'Abbé. Les auteurs trouvent entre $0,180 \pm 0,003$ ml/g et $0,187 \pm 0,003$ ml/g pour des protéines en concentration jusqu'à 0,4 g/ml. Ces valeurs sont en concordance avec la littérature où l'incrément d'indice se situe généralement entre 0,17 et 0,21 [Handbook1960]. La quantité de protéines adsorbées par unité de surface s'élève

à 2,9 mg/m² pour la BSA et à 6,9 mg/m² pour la κ -caséine. Les travaux de de Feijter et ses collaborateurs font référence pour l'estimation de Γ . Le Tableau 8 rapporte des valeurs de $\frac{dn}{dc}$ et de Γ à saturation de la surface pour différentes protéines.

Mårtensson *et al.* ont discuté l'influence de la longueur d'onde utilisée sur l'analyse des données ellipsométriques et en particulier sur l'estimation de Γ [Mårtensson 1995]. L'incrément d'indice et les indices varient en fonction de la longueur d'onde. Le choix de la valeur de l'incrément d'indice n'est donc pas facile. La valeur moyenne mesurée par de Feijter *et al.* ($\frac{dn}{dc} \sim 0,19$) est souvent employée et concevable pour les protéines, mais il n'est pas possible de l'utiliser pour les lipides. En effet, dans l'équation de de Feijter, les auteurs évaluent l'excès de masse constitué par la couche de molécules solubles dans l'eau par rapport à la sous-phase. L'incrément d'indice est l'augmentation de l'indice optique du mélange aqueux en fonction de l'augmentation de la concentration en protéine du mélange. Il n'a donc pas de sens pour les lipides dans le contexte d'une monocouche, puisque les lipides forment une couche dense, sans molécule d'eau incluse.

Protéine	$\frac{dn}{dc}$ (ml/g)	Evaluation de $\frac{dn}{dc}$	Γ (mg/m ²)
[de Feijter 1978] Laser He-Ne $\lambda=632,8$ nm sur eau			
BSA (0,2 wt %) Epaisseur=4,5 nm	0,187±0,003	Réfractomètre d'Abbé	2,9
κ -caséine (0,1 wt %) Epaisseur=15 nm	0,18±0,003	Moyenne sur plusieurs mesures	6,9
Lysozyme	0,186±0,003	Réfractomètre d'Abbé	-
β -lactoglobuline	0,181±0,003	Réfractomètre d'Abbé	-
[Reiter 1993] Laser He-Ne $\lambda=632,8$ nm sur eau			
Streptavidine (0,1 μ M) Indice = 1,470 Epaisseur=4,5 nm	0,212	Réfractomètre d'Abbé	2,83 ± 0,3
[Muller 1998], [Hahn Berg 2001] Lampe Xe, $\lambda=401,5$ nm sur silicium			
Gélatine bovine (0,1wt%) Epaisseur=38 nm	0,19	[Feijter1978, Maternag-han1974]	2,5

Tableau 8 : Calcul de la masse adsorbée à saturation Γ pour différents systèmes.

En conclusion, il est difficile de séparer la contribution des lipides de celle des protéines dans la masse totale. Dans la suite de ce manuscrit, nous qualifions donc Γ de *masse adsorbée apparente*. La combinaison de plusieurs techniques expérimentales s'avère ici indispensable pour une bonne analyse des données ellipsométriques. Par exemple, une mesure de réflectivité X permet une

évaluation précise de l'épaisseur des couches qui peut être utilisée dans la modélisation des angles ellipsométriques. Nous avons indiqué que la contribution de la monocouche de lipides n'est pas additive et représente environ 10% seulement de la masse adsorbée de protéines (Figure 38). Lors de certaines expériences d'ellipsométrie, nous nous intéresserons aux variations relatives de masse adsorbée après changements de la sous-phase. Les valeurs de masse adsorbée Γ sont ainsi converties en un rapport $\Delta\Gamma/\Gamma_i$ où Γ_i est la masse de protéine adsorbée à saturation de la monocouche, choisie comme référence pour chaque couche étudiée. De cette manière, nous nous affranchissons de l'incrément d'indice et réduisons l'importance de la monocouche de lipides.

III.4.2.4 Suivi cinétique ellipsométrique

Jönsson *et al.* ont étudié l'adsorption de protéines sur une interface solide par ellipsométrie [Jönsson 1985]. L'indice et l'épaisseur de la couche de protéines sont calculés par le programme de McCrackin [McCrackin 1969] à partir de $\delta\psi$ et $\delta\Delta$ à la saturation ($\delta\psi$ et $\delta\Delta$ sont les différences de signal avant et après le dépôt de protéine). Les auteurs calculent la masse adsorbée apparente Γ par les deux méthodes de de Feijter [de Feijter 1978] et de Cuypers ([Cuypers 1983], voir Annexe 4) à partir de l'indice et de l'épaisseur de la couche. Ils concluent que Γ est proportionnel à $\delta\Delta$ pour des valeurs de Γ mesurée de 1 à 4 mg/m². Il est aussi possible d'évaluer la densité massique de surface Γ^* d'une monocouche de protéines cristallisée à deux dimensions. Des densités massiques de surface calculées pour plusieurs cristaux bi-dimensionnels de protéines sont présentées dans le Tableau 22 (Annexe 4). La relation $\Gamma^* = \frac{nm_p}{A}$, où n est le nombre de protéines

dans la maille, m_p la masse de la protéine, et A l'aire de la maille cristallographique, décrit la densité massique de surface dans le cristal. Elle correspond à la densité massique de surface maximale de la monocouche, puisque la surface n'est pas entièrement recouverte de cristaux. Dans la plupart des cas, la valeur de 4 mg/m² est dépassée. La densité massique surfacique varie de 1,33 mg/m² à 12,50 mg/m² selon les exemples. L'approximation de Γ linéaire avec les variations de Δ est donc insuffisante pour décrire les couches lipo-protéiques. Pour la protéine HupR, la densité massique de surface est évaluée à 4,9 mg/m² [Courty 2002].

III.4.2.5 Balayage angulaire ellipsométrique

Dans le cas du suivi ellipsométrique angulaire, la cinétique d'adsorption est évidemment moins précise que le suivi cinétique directe (quelques points espacés de 1 à plusieurs heures, contre un suivi point par point toutes les 3 à 10 secondes pour les mesures à angle fixe). Le but n'est donc pas de construire une véritable cinétique de formation de la couche, mais de connaître précisément la quantité de matière à la surface de l'eau pour plusieurs états de la couche au cours de son histoire c'est-à-dire lorsque la formation de la couche de protéine ou tout autre changement est achevée. Les courbes de cinétiques restent utiles pour le suivi des changements rapides.

III.4.2.6 Erreur sur l'évaluation de Γ

Il est possible de fournir une évaluation de la masse adsorbée Γ dans le cas des mesures cinétiques parce que nous enregistrons ψ et Δ . L'estimation est moins précise que dans le cas des mesures angulaires puisqu'un seul couple (ψ, Δ) est mesuré à un angle donné, contre une centaine de couples de mesures acquis lors d'un balayage angulaire. Höök *et al.* indiquent une déviation standard sur la détermination de Γ par ellipsométrie de 10 à 20% [Höök 2001]. Plus précisément, W. Saito *et al.* donnent une erreur sur la détermination de Γ de 10% pour $\Gamma > 1$ mg/m², et de 20% pour $\Gamma < 1$ mg/m² [Saito 1996]. Nous avons estimé l'erreur faite sur l'évaluation de Γ en la calculant, pour une même expérience, à partir des données ψ et Δ cinétiques au plateau de saturation et à partir de la mesure angulaire effectuée immédiatement après. Nous trouvons une différence de Γ de 0,4 mg/m². Nous estimons de manière générale que l'erreur sur la détermination de la densité massique de surface obtenue par les mesures ellipsométriques est de 0,5 mg/m², soit 10 % pour $\Gamma > 5$ mg/m².

III.4.3 Cas de la protéine HupR

Il est possible d'évaluer la masse de protéine présente dans les cristaux bidimensionnels de HupR à partir de la maille du cristal, de la masse de la protéine et du nombre de protéine par maille (voir Annexe 4). On trouve une densité massique surfacique de 4,9 mg.m⁻² [Courty 2002]. Par les méthodes décrites dans ce chapitre, nous avons évalué la masse de protéine HupR greffée à des lipides à partir des mesures de réflectivité des rayons X et d'ellipsométrie. Une heure après l'injection des protéines, la masse adsorbée apparente de protéine évaluée à partir des courbes ellipsométriques angulaires (Figure 37) est de 3,1 mg/m². Dix-sept heures après l'injection, elle est de 5,1 mg/m². L'analyse du profil de densité électronique de la protéine HupR (voir la Figure 26) indique qu'une masse de 5,8 mg.m⁻² est greffée à la monocouche lipidique. Une erreur d'environ 10% peut être attribuée à la valeur déterminée par la mesure de réflectivité, en provenance de la mesure et de l'ajustement. Ces valeurs sont reportées dans le Tableau 9. Les évaluations expérimentales sont en très bon accord avec la détermination de la masse présente dans les cristaux bi-dimensionnels. Nous utiliserons donc ces méthodes pour déterminer la masse de protéine contenue dans les monocouches de cadhérine.

	Cristaux 2D [Courty 2002]	Ellipsométrie	Réflectivité X
Protéine HupR	4,9 mg.m ⁻²	5,1 ± 0,5 mg.m ⁻²	5,8 ± 0,6 mg.m ⁻²

Tableau 9 : Densité de masse surfacique de protéine HupR dans une couche greffée à une monocouche lipidique.

Chapitre IV Structures des monocouches de cadhérines et interactions dépendantes du calcium

Dans ce chapitre, nous présentons des mesures complémentaires d'ellipsométrie et de réflectivité X effectuées sur des monocouches de C- et de VE- cadhérines. Notre système de référence est une monocouche de cadhérines dans des conditions assurant à la fois un bon repliement de la protéine et permettant *a priori* aux cadhérines d'interagir entre elles de manière parallèle et anti-parallèle, c'est-à-dire une concentration élevée en calcium, au-dessus de 1 mM Ca [Pertz 1998]. A partir de ce point de départ, afin de sonder la présence de dimères anti-parallèles ancrés aux lipides, nous avons effectué des mesures à plusieurs concentrations de calcium inférieures à 1 mM. L'action d'un chélatant d'ions divalents sur les complexes de cadhérines a également été examinée. Nous avons comparé la quantité de protéines adsorbées et la structure de ces couches. Enfin, pour tester l'activité adhérente des protéines et chercher à localiser les interactions entre domaines, nous avons injecté divers fragments de cadhérines en sous-phase et suivi l'évolution de la quantité de protéines adsorbées et du profil de densité électronique de la couche.

Les ajustements de courbes théoriques aux mesures de réflectivité X présentée dans ce chapitre ont été calculés par les programmes *Parratt32* [Parratt32] et *R.Ober* [Bardon1999].

Nous présentons d'abord les monocouches de lipides seuls, avant d'aborder l'étude des couches lipo-protéiques de C-cadhérine, puis de VE-cadhérine.

IV.1 Lipides seuls

Cette section expose des expériences de réflectivité des rayons X préliminaires à l'étude des cadhérines et de leurs interactions. Nous nous intéressons aux monocouches de lipides seuls pour pouvoir par la suite distinguer leur contribution dans les profils de densité électronique des couches lipides+protéines.

Idéalement, la contribution des lipides devrait être soustraite pour laisser apparaître seulement la couche de protéines. Cependant, nous verrons qu'il existe une disparité dans les monocouches de lipides et une certaine interpénétration des couches qui rend la soustraction délicate. Les courbes de réflectivité

X sur les lipides seuls restent très utiles pendant le déroulement des expériences puisqu'elles permettent de mettre en évidence l'adsorption de la protéine en surface en temps réel.

Nous présentons ici les mesures effectuées sur les lipides Ni-NTA-DLGE utilisés pour l'ancrage des protéines et sur le mélange de lipides diluants DOPS:DOPE (1:7).

IV.1.1 Lipides ligands Ni-NTA-DLGE

Lors de chaque série d'expériences faites à l'ESRF, nous avons enregistré une courbe de réflectivité X sur les lipides Ni-NTA-DLGE seuls. Le même lot de lipides a été utilisé. Les courbes sont nommées *A* pour la plus ancienne, *B* pour la mesure intermédiaire et *C* pour la plus récente. La tension de surface a été mesurée lors des dépôts des couches *B* et *C*, les lipides étant déposés jusqu'à ce que la pression de surface soit constante. Lors de l'expérience *A*, les lipides ont été déposés jusqu'à observation visuelle de la saturation de la monocouche (voir II.2.2). La Figure 40 compare les courbes de réflectivité *A*, *B* et *C* obtenues. Le signal de réflectivité est multiplié par q_z^4 pour compenser l'approximation asymptotique de la loi de Fresnel pour les vecteurs d'onde supérieurs au vecteur d'onde critique q_c , ce qui a pour effet d'amplifier les oscillations traduisant la présence d'une couche fine sur le substrat. Pour des vecteurs d'onde inférieurs à q_c , la réflexion est totale. Ceci se traduit sur ces courbes par une croissance en q_z^4 . Le bruit de fond devient comparable à la mesure de l'intensité au grands vecteurs d'onde, ce qui se traduit par une plus grande incertitude.

Pour chaque mesure, un profil de densité électronique a été obtenu à l'aide du programme *Parratt32* en utilisant un modèle à deux couches, une pour la tête polaire des lipides et une pour leur chaîne aliphatique. Au total, un tel système est représenté par onze paramètres pouvant être ajustés : les densités électroniques (3), parties imaginaires de l'indice de réfraction (3) et rugosités (3) pour les deux couches et le substrat ainsi que l'épaisseur de chaque couche (2). Pour réduire le nombre de paramètres, nous avons négligé les coefficients d'absorption en considérant que les matériaux que nous étudions ne sont pas absorbants aux longueurs d'onde utilisées.

La densité électronique du substrat est fixée à celle de l'eau ($0,334 \text{ e.Å}^{-3}$). Dans un premier temps, les rugosités des interfaces sont également fixées à celle de l'eau (3 Å, [Braslau1988]), ce qui laisse quatre paramètres ajustables. Ces paramètres sont modifiés d'abord manuellement pour approcher la courbe de réflectivité expérimentale, puis des ajustements successifs sont effectués en libérant progressivement les paramètres. Enfin, les rugosités sont ajustées. Le Tableau 10 rassemble les paramètres déterminés par les ajustements des trois couches de lipides Ni-NTA-DLGE représentées Figure 40. La Figure 41 présente les profils de densité électronique correspondants.

L'épaisseur totale de la couche de lipides Ni-NTA-DLGE est d'environ 30 Å pour les trois couches. Elle est tout à fait comparable d'une part aux valeurs de 30 Å et 28,24 Å calculées en tenant compte de la longueur des chaînes aliphatiques étirées dans le chapitre précédent (Tableau 2, p. 26) et d'autre part à celle

mesurée par S. Sivasankar par mesure de force de surface ($27 \pm 5 \text{ \AA}$) [Sivasankar2001a].

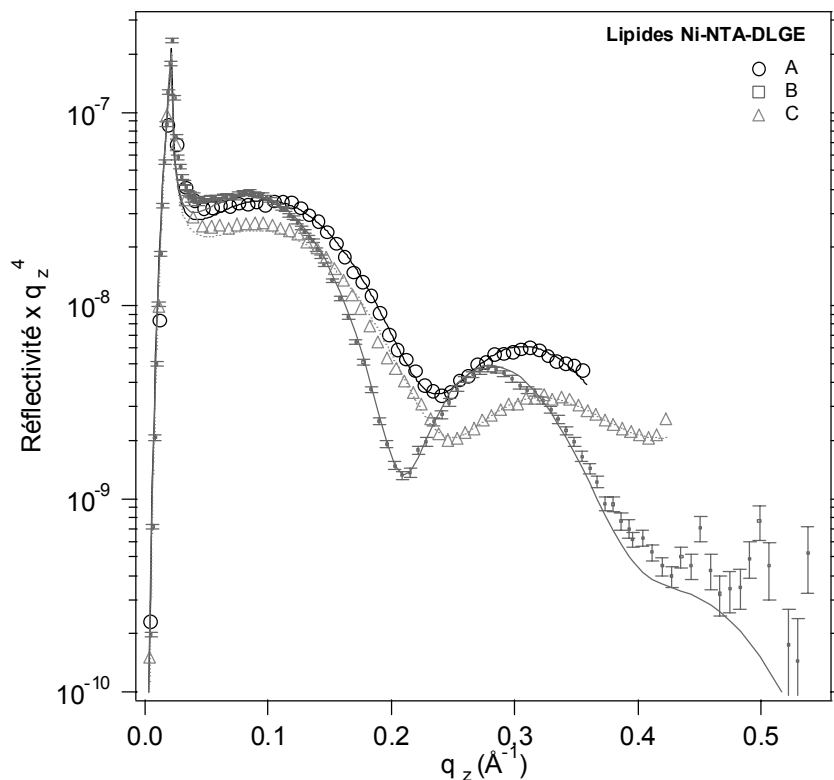


Figure 40 : Comparaison des courbes de réflectivité X mesurées sur les monocouches de lipides Ni-NTA-DLGE A, B, et C (symboles) et calculées (traits pleins). Pour plus de clarté, une partie des points de mesures a été supprimée et les barres d'erreur ne sont représentées que sur la courbe B.

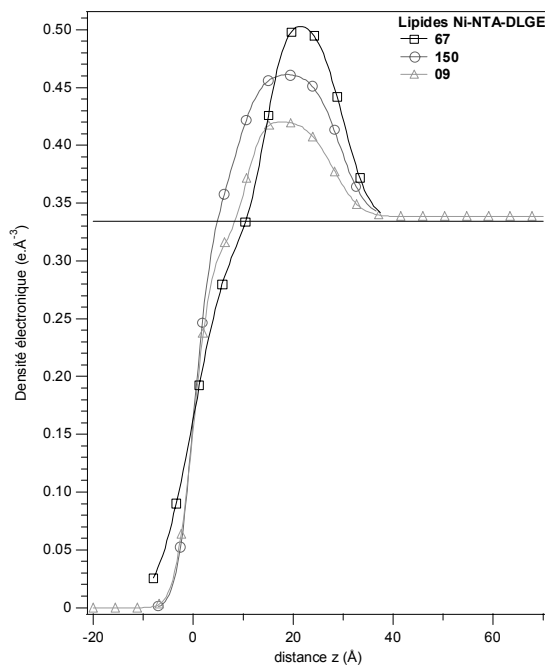


Figure 41 : Profils de densité électronique des lipides Ni-NTA-DLGE associés aux courbes calculées de la Figure 40. Notations : courbe 67=A, 150=B, 09=C.

La densité électronique de la couche décrivant les chaînes aliphatiques est inférieure à la valeur attendue, 0,27 e.Å⁻³ [Als-Nielsen 1991]. La région polaire des lipides est plus épaisse que la longueur attendue et en revanche, les chaînes aliphatiques apparaissent plus courtes. Cela peut s'expliquer par la difficulté d'estimer la longueur et l'inclinaison de l'espaceur et du groupement NTA.

Les paramètres d'épaisseurs des deux couches de l'ajustement ne sont pas indépendants, puisque la longueur totale est conservée pour les trois ajustements et très proche de la valeur attendue (voir Tableau 10). H. Möhwald *et al.* ont indiqué une imprécision sur le partage des couches de ± 5 Å, soit deux fois plus grande que l'erreur sur la détermination de l'épaisseur totale des lipides (± 2 Å) [Möhwald 1995]. Il est donc possible que les longueurs que nous trouvons pour les deux couches ne décrivent pas exactement les tailles de la chaîne et de la tête des lipides. Un modèle à trois couches pourrait permettre de mieux décrire les courbes de réflectivité X sur les lipides : les trois couche décrivant respectivement les chaînes aliphatiques, les têtes polaires et les groupements NTA.

La surface occupée par un lipide est évaluée à partir de la densité électronique de la couche suivant la formule $S = \frac{n_e}{\rho \cdot d}$ où S est la surface, n_e le nombre d'électrons, d l'épaisseur et ρ la densité électronique.

	Ni-NTA-DLGE #A	Ni-NTA-DLGE #B	Ni-NTA-DLGE #C	DOPS:DOPE (1:7)
Couche 1				
d (Å)	14,6	8,4	10,6	13,7
ρ (e.Å ⁻³)	0,324	0,313	0,321	0,320
σ (Å)	5,63	2,65	2,90	2,90
Couche 2				
d (Å)	15,4	21,0	17,5	11,8
ρ (e.Å ⁻³)	0,505	0,454	0,418	0,564
σ (Å)	3,07	3,91	2,56	2,77
Substrat				
ρ (e.Å ⁻³)	0,334	0,336	0,336	0,336
σ (Å)	4,12	4,08	4,17	3,42
Total				
d (Å)	30,0	29,4	28,1	25,5
Nombre d'élec- trons	467	467	467	420
Surface (Å ²)	37,2	38,1	44,0	38,1
Densité (mg/m ²)	3,8	3,7	3,2	3,3

Tableau 10 : Modèles des ajustements des courbes de lipides Ni-NTA-DLGE et du mélange de lipides DOPS:DOPE (1:7) et calculs de surface par lipide correspondants. d : épaisseur, ρ : densité électronique, σ : rugosité.

Pour les lipides Ni-NTA-DLGE, l'isotherme de compression (voir Figure 13, p. 23) indique une aire par molécule au collapse de 40,6 Å²/lipide alors que les mesures de réflectivité donnent une aire moyenne des lipides entiers variant de

37,6 Å² pour les plus anciens (A), à 38,5 Å² (B) et 44,5 Å² pour les plus récents (C).

Le calcul de la masse correspondant aux lipides se fait grâce à la relation densité électronique-densité massique décrite précédemment (III.4.1, p.64). Nous trouvons des masses surfaciques similaires à la masse calculée d'après l'aire par molécule au collapse : 40,6 Å²/lipide Ni-NTA-DLGE, soit 3,5 mg/m². La couche des lipides récente © est plus fine que les autres. Les lipides sont donc plus espacés dans cette couche. Cela se traduit par une chute de la densité et une augmentation de l'aire par molécule. La densité électronique moyenne de la couche de lipides varie d'environ 0,42 e.Å⁻³ pour les deux premières couches (A-B) à 0,378 e.Å⁻³ pour la plus récente ©. La masse surfacique suit la même évolution de 3,7 mg/m² (A) ou 3,8 mg/m² (B) à 3,2 mg/m² (C).

Il apparaît ainsi une évolution entre les trois courbes : diminution de l'épaisseur totale, diminution de la densité électronique globale et au niveau des têtes polaires corrélée avec une augmentation de l'aire par molécule. Deux explications peuvent être apportées. Il se peut qu'au cours du vieillissement des lipides, certains ions Ni²⁺ se soient dissociés des groupements NTA. Cependant, la perte d'un ion nickel (24 électrons) par lipide ne serait pas suffisante pour expliquer la baisse de densité électronique. Il est également possible que les couches B et C contiennent simplement moins de lipides que la première, c'est-à-dire qu'ils forment une couche moins dense. Les chaînes aliphatiques peuvent être dans ce cas inclinées vers la surface et les bras espaceurs orientés de manière plus aléatoire. Cela expliquerait l'inclinaison des chaînes aliphatiques et les faibles densités des deux couches de l'ajustement observées pour les courbes B et C. Au contraire, la courbe de réflectivité A présente un minimum piqué correspondant à une interface de densité électronique abrupte entre les têtes polaires lipides et la sous-phase.

La possibilité de perte d'ions nickel reste toutefois plausible. Pour vérifier cette hypothèse, les lipides pourraient être rechargé²¹ en ion Ni²⁺. Il serait également intéressant d'utiliser une cuve échantillons avec une barrière de compression afin de contrôler la pression de surface des lipides lors de la mesure.

IV.1.2 Mélange de lipides diluants DOPS:DOPE (1:7)

Les courbes de réflectivité X mesurées et calculées correspondants aux lipides Ni-NTA-DLGE et au mélange DOPS:DOPE (1:7) sont représentées sur la Figure

²¹ L. Lebeau du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée à Strasbourg propose le protocole simplifié suivant (*communication personnelle*). Les lipides doivent être évaporés à sec, puis dilués dans du chloroforme à une concentration d'environ 1 à 10 mg/ml. Cette solution sera mélangée à un volume d'une solution aqueuse de NiCl₂ à une concentration 5 mg/ml. L'émulsion obtenue sera agitée pendant 5 minutes puis laissée à décanter. La phase aqueuse sera alors éliminée avec une pipette (phase supérieure). Pour éliminer les traces d'ions nickel non complexé, l'opération sera répétée trois fois après avoir ajouter 1 volume d'eau pure à la phase organique.

42 et les profils de densité électronique sur la Figure 43. Pour la comparaison, nous avons choisi la couche de lipides Ni-NTA-DLGE la plus ancienne (courbe A) car, dans le cas de l'hypothèse de vieillissement des lipides, elle correspond aux lipides les plus frais. Le profil de densité électronique indique que la tête polaire des lipides ligands Ni-NTA-DLGE est moins dense mais plus étendue que celle du mélange de lipides DOPS:DOPE (1:7). Cela est dû à la présence du bras espaceur liant le groupement NTA et l'ion Ni^{2+} à la tête des lipides Ni-NTA-DLGE.

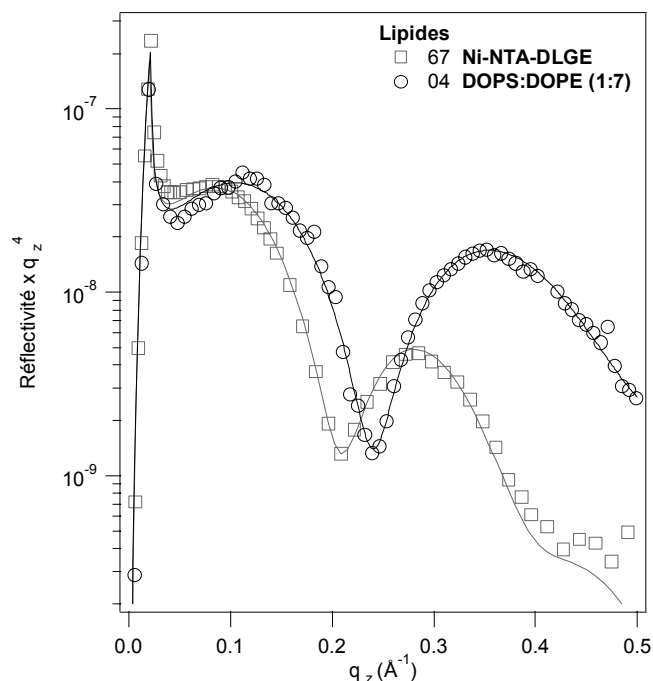


Figure 42 : Comparaison des courbes de réflectivité X mesurées (symboles, pour plus de clarté, un points de mesures sur cinq est conservé) et calculées (traits pleins) lipides Ni-NTA-DLGE et au mélange DOPS:DOPE (1:7)

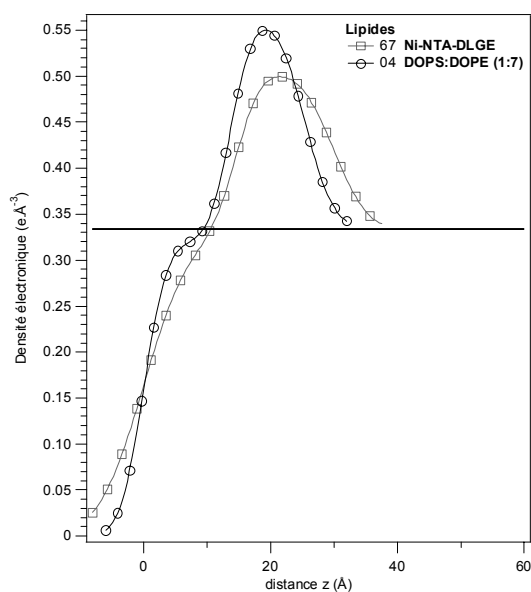


Figure 43 : Comparaison des profils de densité électronique correspondant aux lipides Ni-NTA-DLGE et au mélange DOPS:DOPE (1:7).

IV.1.3 Conclusion

Les profils de densité électronique obtenus pour les lipides sont nécessaires pour la comparaison avec les profils de densité électronique des couches de protéines. Ne connaissant pas les détails structuraux de l'interaction entre la protéine et le lipide, il n'est pas possible de soustraire simplement la contribution des lipides au profil de densité électronique de la couche lipo-protéique. A basse résolution, nous pouvons néanmoins l'estimer à partir des mesures présentées ici. Nous obtenons un profil de densité électronique des protéines seules que nous jugeons satisfaisant jusqu'à une distance proche des lipides. Il se trouve alors une couche mince d'environ 1nm dans laquelle il n'est pas possible de différencier les deux contributions. Les profils de densité électronique sont légèrement différents d'une monocouche de lipides à l'autre. Cela provient notamment du fait que, pendant la mesure de réflectivité X, il n'était pas possible de contrôler pas la tension de surface de la couche.

IV.2 Etude du fragment C-EC1-5His de C-cadhérine

Ce travail a été effectué en collaboration avec D. Leckband et S. Sivasankar de l'Université d'Illinois à Urbana-Champaign (Etats-Unis). L'objet de cette collaboration est l'étude des mécanismes d'interactions homotypiques entre molécules d'adhérence cellulaire et en particulier l'étude de la partie extracellulaire de C-cadhérine.

Dans le cadre de l'étude des molécules d'adhérence cellulaire, D. Leckband utilise un appareil de mesure de force de surface permettant de déterminer les forces d'interaction entre deux monocouches de protéines greffées sur des surfaces de mica plat à l'échelle atomique [Leckband 1993, Leckband 1995]. La force mesurée est reliée aux interactions entre plus de 10^5 molécules. Elle apporte donc des informations sur les interactions moyennes entre les molécules. Dans cet appareil, la distance entre les deux surfaces est mesurée avec une résolution de 0,1 nm par interférométrie optique. La force mesurée est proportionnelle à l'énergie d'interaction multipliée par le rayon de courbure de la surface. La détermination de la force entre les deux surfaces conduit à une résolution de 0,1 mN/m sur l'énergie d'interaction [Leckband 1995].

Les surfaces de mica utilisées par S. Sivasankar *et al.* dans l'appareil de mesure de force sont recouvertes de lipides chélatant les ions nickel afin de fixer des fragments de C-cadhérine C-EC1-5His [Sivasankar 1999, Sivasankar 2001b]. lors de ces expériences, les monocouches du fragment C-EC1-5His sont préparées en l'absence de calcium, les fragments ayant au préalable incubé 30 minutes dans une solution tampon contenant environ 28 mM d'EDTA afin de dissocier les complexes *cis* et *trans* de C-cadhérine et d'obtenir une monocouche de fragments monomériques [Sivasankar2001a]. Les mesures de force de surface ont ensuite été effectuées en présence d'ions calcium pour permettre les interactions entre fragments de C-cadhérine (solution contenant 2 mM d'ions Ca^{2+}). Les monocouches de lipides utilisées sont constituées de mélanges de lipides ligands et diluants de manière à obtenir une monocouche de fragments C-EC1-5His monomériques suffisamment espacés les uns des autres pour permettre les interactions entre les fragments des surfaces en vis-à-vis.

Sivasankar *et al.* ont mesuré les énergies d'interaction entre deux monocouches des fragments extracellulaires C-EC1-5His de C-cadhérine et ont ainsi déterminé trois alignements adhérents antiparallèles [Sivasankar 2001b]. La Figure 9 (chapitre II) présente schématiquement les trois types d'association anti-parallèle observées. Ces mesures suggèrent que le mécanisme de dissociation des complexes de fragments extracellulaires de C-cadhérines n'est pas abrupt, mais que les fragments "glissent" les uns sur les autres en interagissant successivement selon les trois types d'association. D'après les auteurs, le détachement entre les fragments de C-cadhérine en trois étapes successives pourrait servir de frein naturel à la dissociation des complexes antiparallèles de cadhérines reliant deux cellules adjacentes et ralentir de ce fait la rupture de l'adhérence entre les cellules. Ce mécanisme pourrait ainsi stabiliser les jonctions adhérentes entre les cellules. Cependant, ce détachement en trois étapes ou *glis-*

sement des fragments extracellulaires de C-cadhérine conduit à une incertitude dans la détermination des domaines extracellulaires impliqués dans les complexes successifs.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à déterminer la structure de monocouches de complexes *cis* ou *trans* de fragments extracellulaires de C-cadhérine, afin de localiser les interactions le long des domaines. La technique de réflectivité des rayons X sur des monocouches de lipides+protéines, qui permet de déterminer des profils de densité électronique suivant la normale à la monocouche, est donc bien adaptée à cette étude. Nous avons cherché à caractériser l'orientation des fragments de C-cadhérine dans les complexes, c'est-à-dire si les complexes sont formés de fragments parallèles ou antiparallèles. L'ellipsométrie nous a permis d'évaluer une densité surfacique apparente de fragments C-EC1-5His ancrés à une monocouche de lipides et la variation de cette densité en fonction de la concentration environnante en calcium.

Dans cette section, la mise en évidence de la formation d'une monocouche de C-cadhérines C-EC1-5His par l'interaction de l'étiquette polyhistidine avec l'ion nickel des lipides ligands Ni-NTA-DLGE est d'abord présentée. Puis, nous présentons les variations d'adsorption du fragment C-EC1-5His de C-cadhérine à une monocouche de lipides en fonction (1) de la concentration initiale en calcium de la sous-phase que nous faisons varier de 0 mM à 5mM CaCl_2 ; (2) de l'appauvrissement de la concentration en calcium par dilution ou par ajout du chélatant EGTA.

Nous présentons enfin des expériences d'auto-assemblage de fragments C-EC1-5His et des essais de formations de complexes mixtes de C-EC1-5His avec les fragments de C-cadhérine plus courts comportant un nombre restreint de modules extracellulaires.

IV.2.1 Interaction non-spécifique

Les fragments que nous avons étudiés sont composés des cinq domaines extracellulaires de C-cadhérine et d'une étiquette polyhistidine en position C-terminale (voir II.1.4.1, p. 16). L'objet de cette section est de vérifier que les protéines s'ancrent aux lipides via des interactions entre une histidine et un ion nickel en évaluant l'adsorption dite non-spécifique, c'est-à-dire la quantité de protéines qui se déposent sous les lipides en l'absence de cette interaction.

Pour ce faire, nous avons élaboré une monocouche de lipides diluants DOPC sans lipides ligands et procédé à des mesures ellipsométriques sur la monocouche de lipides avant et après l'injection du fragment dans la sous-phase. Après l'injection des protéines, la sous-phase a été homogénéisée par la pompe péristaltique pendant 1h50. Le signal devient assez bruité comme le montre le suivi cinétique présenté sur la Figure 44. Des mesures ellipsométriques angulaires successives ont été enregistrées et sont présentées sur la Figure 45. Les mesures ont été effectuées sur la solution tampon seule et sur la monocouche de lipides DOPC avant l'injection du fragment C-EC1-5His, puis 45 minutes et 26 heures après l'injection. Pour chacune nous avons calculé une courbe ellipsométrique en faisant varier les paramètres (indice du substrat, indice et épaisseur de la cou-

che) pour obtenir le meilleur ajustement visuel. A partir de ces paramètres, nous avons calculé la masser adsorbée apparente à partir de l'équation de de Feijter (voir III.4.2.2, p. 66).

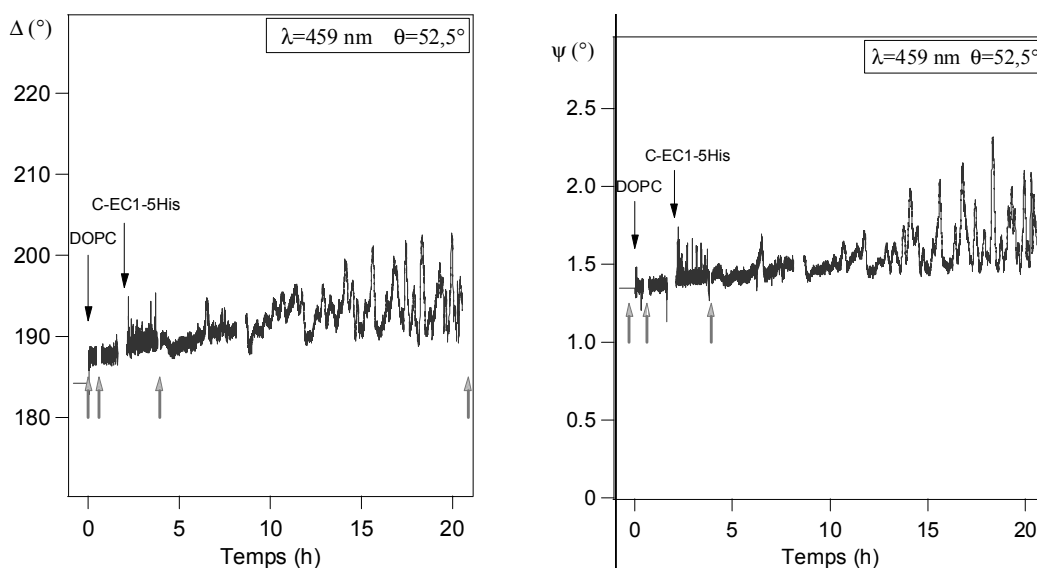


Figure 44 : Suivi cinétique ellipsométrique des angles Δ et ψ . Le dépôt des lipides DOPC puis l'injection des fragments C-EC1-5His sont indiqués. Les flèches grises indiquent les instants où ont été enregistrées les mesures angulaires successives présentées sur la Figure 45. Conditions Expérimentales : $[C-EC1-5His] = 0,5 \mu M$, $[Ca^{2+}] = 2 mM$.

Les courbes ellipsométriques successives sont très semblables à celle des lipides seuls. La monocouche semble donc constituée essentiellement de lipides. Le suivi cinétique montre que la quantité de matière adsorbée à la surface fluctue dans le temps, ce qui traduit une forte hétérogénéité de la couche avec vraisemblablement des îlots de protéines ou d'impuretés. Une couche résiduelle de matière est observée à la surface de la solution tampon avant même le dépôt des lipides. Ce sont probablement des surfactants provenant du tampon et restant après le lavage des cellules en Teflon. Nous avons toujours observé de telles couches de pollution qui ne semblent pas affecter l'ancrage des protéines. Nos mesures étant par la suite des moyennes sur de grandes surfaces par rapport à la taille des éventuelles d'impuretés, elles n'y sont pas sensibles. Une méthode d'imagerie, comme le microscope à angle de Brewster, sera beaucoup plus sensible à ces impuretés.

Nous avons mentionné que l'équation de de Feijter n'a pas de sens pour évaluer la masse surfacique apparente d'une monocouche lipidique (voir III.4.2.2, p. 66). En effet, la masse adsorbée apparente de la monocouche de lipides DOPC est estimée ici à $0,9 mg/m^2$ par application de cette équation. La masse molaire du lipide DOPC étant de $786 g/mol$, cette masse surfacique représente une aire moyenne par lipide de 148 \AA^2 ($aire (\text{\AA}^2) = \frac{m_{lipide} (g)}{\Gamma (mg/m^2)} \cdot 10^{23}$, où m_{lipide} est la masse

d'un lipide). Les lipides ont été déposés à une pression de surface de $48 mN/m$. Or, l'isotherme d'une monocouche de lipides DOPC indique que, juste avant le collapse de la monocouche pour une pression de surface de $45 mN/m$, l'aire par molécule est de 70 \AA^2 (Mozzaffary1994). L'aire par lipide mesurée par ellipsomé-

trie est donc sur-évaluée. Ce paradoxe provient du choix de l'incrément d'indice $\frac{dn}{dc}$ utilisé dans l'équation de de Feijter. Cependant, nous verrons que la masse de protéines adsorbées spécifiquement est près de 10 fois supérieure à celle de lipides. Nous continuerons donc d'utiliser l'approximation de de Feijter *et al.* avec $\frac{dn}{dc} = 0,19$ pour calculer les densités massiques de surface de la couche lipid+protéines.

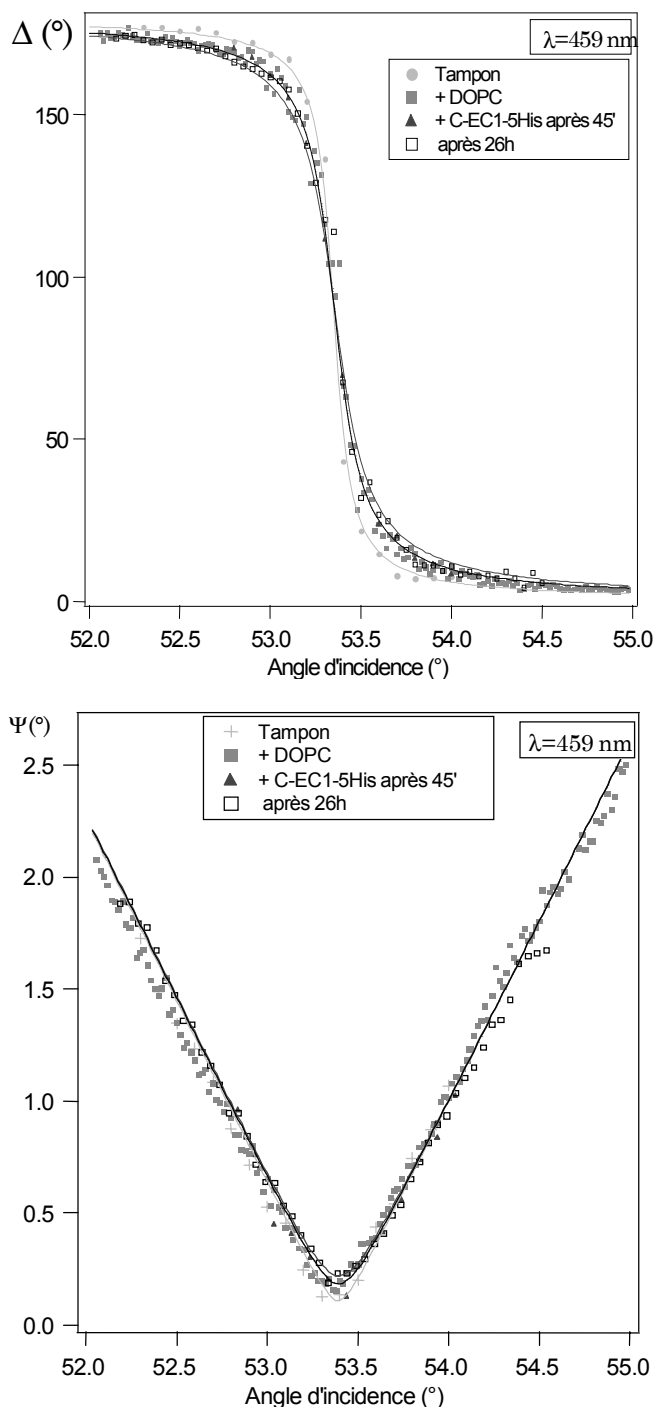


Figure 45 : Mesures ellipsométriques angulaires sur une couche de lipides DOPC avant et après injection du fragment C-EC1-5His. Les mesures sont représentées par des symboles et les courbes calculées par des lignes pleines. Conditions Expérimentales : $[\text{C-EC1-5His}] = 0,5 \mu\text{M}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 2 \text{ mM}$.

En conclusion, très peu de fragments de C-cadhérine se sont déposés sous la monocouche de lipides DOPC. L'adsorption non spécifique sous les lipides est négligeable pour notre étude. Dans la suite de cette étude, nous présentons des expériences réalisées avec des lipides ligands possédant un ion nickel. L'interaction entre l'ion nickel et l'étiquette polyhistidine permettra d'obtenir une monocouche de fragments de C-cadhérine orientés de la même manière que les cadhérines à la surface d'une cellule.

IV.2.2 Effets de la concentration initiale en calcium

D'après le modèle d'interaction entre fragments extracellulaires de E-cadhérine de O. Pertz *et al.*, les cadhérines forment des assemblages antiparallèles pour une concentration élevée en calcium, c'est-à-dire supérieure à 1 mM (voir II.1.3.1, p. 8) [Pertz 1998]. Ces complexes *trans* sont vraisemblablement composés de deux dimères parallèles en vis-à-vis. Entre 0,5 mM et 1 mM de calcium, seuls les complexes parallèles peuvent se former et pour des concentrations en calcium inférieures à 0,5 mM, aucune interaction entre les cadhérines n'est observée. Dans cette section, nous cherchons à déterminer la structure transversale et la densité surfacique de monocouches de fragments C-EC1-5His en fonction de la concentration initiale en calcium de la sous-phase. Par ces mesures, nous cherchons à déterminer l'état oligomérique de fragments de C-cadhérine liés aux lipides, c'est-à-dire si les fragments se sont adsorbés sous forme monomérique ou sous forme de complexes *cis* ou *trans*.

IV.2.2.1 Monocouche de référence : $[Ca^{2+}] = 5 \text{ mM}$

Nous appelons "référence" une monocouche de fragments C-EC1-5His ancrés à des lipides ligands Ni-NTA-DLGE, dans une sous-phase constituée de solution tampon contenant 5 mM de $CaCl_2$. A une telle concentration en calcium, les cadhérines sont capables de former des associations *cis* et *trans*.

Mesure ellipsométrique

Une mesure de la cinétique de l'adsorption des fragments C-EC1-5His aux lipides Ni-NTA-DLGE par ellipsométrie est présentée sur la Figure 46. La concentration initiale de la solution de fragment C-EC1-5His est de 18,6 μM , ce qui équivaut à près de 40 % de dimères et 60 % de monomères d'après la courbe d'équilibre dimère-monomère déterminée par S. Chappuis-Flament *et al.* (Figure 10, p.18) [Chappuis-Flament 2001]. Après injection de cette solution protéique dans la sous-phase, une concentration de la solution de fragments C-EC1-5His dans la sous-phase de 1 μM est atteinte, ce qui est suffisant pour une adsorption assez rapide.

Le temps $t=0$ est fixé à l'instant de l'injection des protéines. L'adsorption peut être décrite en deux étapes : une première très rapide de cinq minutes où ψ atteint 85% de sa valeur de plateau, puis un processus lent ellipsométriques d'environ sept heures menant à la stabilisation des angles ellipsométriques à $\psi=3,60^\circ$ et $\Delta=210,1^\circ$. Par comparaison de ces valeurs aux angles calculés par le

programme *Fresnel* (voir III.2, p. 39), et en utilisant la relation de de Feijter, une densité massique de surface de 10,1 mg/m² est évaluée.

Un même type de comportement d'adsorption en deux étapes a été observé par Reiter *et al.* lors de la formation d'une monocouche de streptavidine ancrées à des lipides biotinylés [Reiter1993]. Pour les auteurs, la première étape rapide est due à la concentration initiale en protéine élevée qui entraîne une forte concentration locale au voisinage de la surface. Les protéines se lient immédiatement aux lipides, puis le lent processus consécutif serait dû à un réarrangement des protéines en surface. Nous avons observé ce phénomène plusieurs fois pour des concentrations de la sous-phase en fragments de C-cadhérines de 1μM ou 1,5μM.

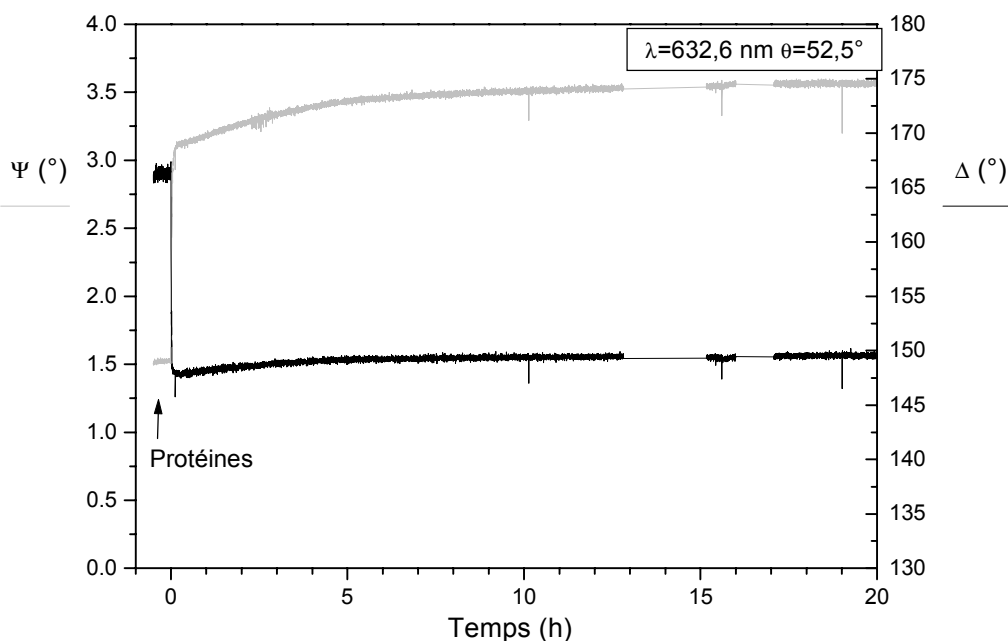


Figure 46 : Cinétique d'adsorption de la cadhérine C-EC1-5His aux lipides Ni-NTA-DLGE. Conditions Expérimentales : [C-EC1-5His]=1μM, [Ca²⁺] = 5 mM, angle d'incidence 52,5°, λ=400 nm (ψ en clair, Δ en noir). La flèche indique l'injection des protéines.

Réflectivité des rayons X

Sur la Figure 47 sont présentées une courbe de réflectivité X mesurée sur une couche de référence après environ 4 heures d'incubation et une courbe calculée et ajustée par le programme *RefX*. Des interférences de courte période en q_z apparaissent superposées à l'oscillation principale attribuée aux lipides. Elles traduisent la présence d'une couche supplémentaire d'environ 19 nm. Le profil de densité électronique qui est déterminé à partir de cet ajustement est présenté Figure 48 ainsi que le profil de densité électronique de la monocouche de lipides seuls.

Le profil de densité électronique présente un pic de forte densité entre 0 et 3,7 nm qui correspond aux lipides et à une partie du fragment C-EC1-5His près de l'ion Ni²⁺. Une couche de densité électronique moyenne 0,378 e.Å⁻³ s'étend d'une profondeur de 3,7 nm à 17,2 nm. Cette couche peut être divisé en deux

parties : la première de 7,5 nm d'épaisseur présente un maximum de densité électronique de $0,394 \text{ e.Å}^{-3}$ et la seconde est épaisse de 6,2 nm et avec un maximum de $0,376 \text{ e.Å}^{-3}$. Puis, à partir d'une profondeur de 17 nm, le profil décroît lentement vers la densité électronique de l'eau qui est atteinte à une profondeur de 20 nm.

Cette décroissance lente qui peut être décrite comme une apparente rugosité de la monocouche est commune à tous les profils de densité électronique que nous avons évalués. Elle peut provenir d'une part de l'ajustement utilisé et en particulier de l'épaisseur maximale autorisée et d'autre part de la monocouche de protéines elle-même qui peut présenter une inhomogénéité d'épaisseur. Par conséquent, nous considérerons que la couche lipides+protéines mesure 19 ± 1 nm, en prenant comme limite à l'épaisseur de la couche le milieu de la décroissance de densité électronique. D'après le profil de densité électronique des lipides seuls, la monocouche de lipides a une épaisseur de 3 nm. Au sein de la couche lipides+protéines, les fragments C-EC1-5His forment donc une couche de 16 nm.

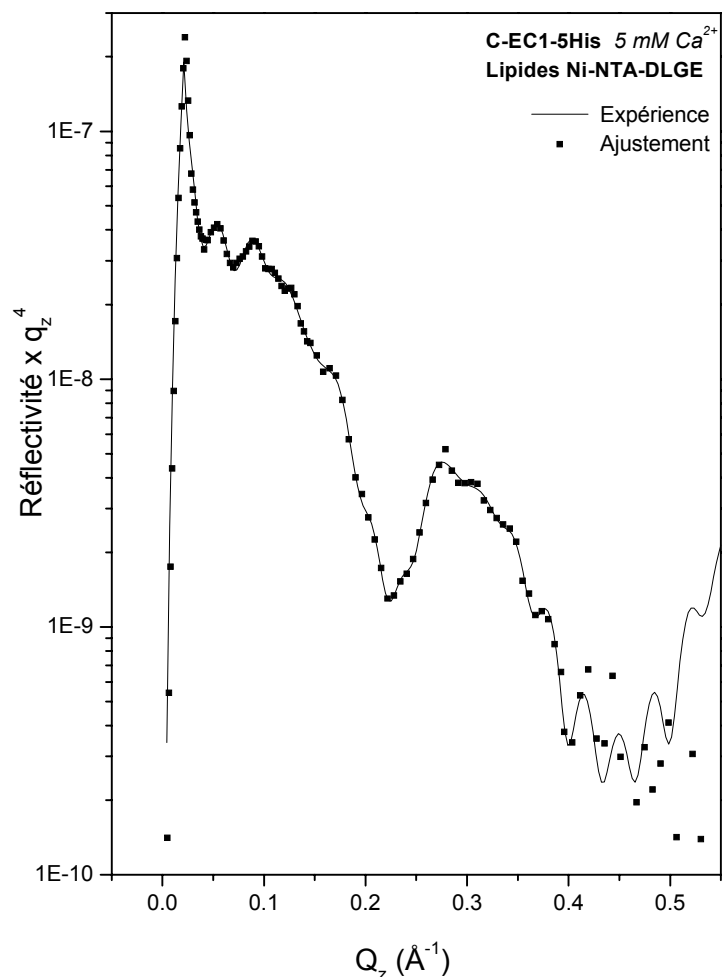


Figure 47 : Courbe de réflectivité (\square) et ajustement (-) par un modèle sur une monocouche de C-cadhérine C-EC1-5His ancrée à une monocouche de lipides Ni-NTA-DLGE. Conditions Expérimentales : $[\text{Ca}^{2+}] = 5 \text{ mM}$, $[\text{C-EC1-5His}] = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$.

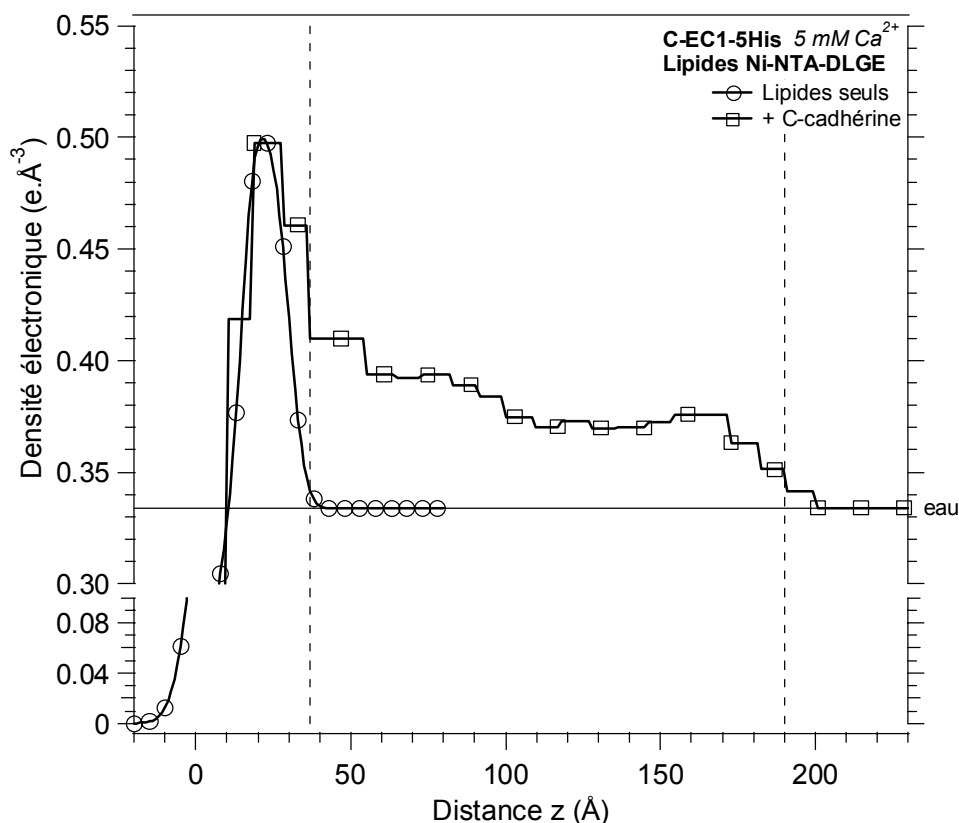


Figure 48 : Profils de densité électronique comparés : lipides Ni-NTA-DLGE seuls et avec la monocouche de C-cadhérine C-EC1-5His. La densité électronique de l'eau est indiquée à $0,334 \text{ e.Å}^{-3}$.

Masse de protéine dans la monocouche

La proportion d'eau et de cadhérine dans la monocouche présentée sur la Figure 49 a été calculée à partir de la densité électronique moyenne du fragment C-EC1-5His évaluée à $0,417 \text{ e.Å}^{-3}$ (voir III.4.1.2, p. 65). La couche de fragments est composée en moyenne de 53 % de cadhérine et 47 % d'eau. La contribution des lipides a été soustraite mais l'opération est délicate et un peu faussée près de la tête polaire des lipides. A partir de cette courbe, il est aisé de calculer la densité électronique de protéine seule et la densité massique de protéine en surface par la méthode décrite précédemment (paragraphe III.4.1.4). Ensuite, la densité massique dans la couche de protéine en fonction de la profondeur z est utilisée pour calculer la masse totale de fragments C-EC1-5His liés aux lipides. La densité massique surfacique de protéines dans cette monocouche est de $8,1 \text{ mg/m}^2$. Cette valeur est proche de l'estimation par ellipsométrie de la masse apparente lipide+protéine ($10,1 \text{ mg/m}^2$ après 20 heures d'incubation). Dans le calcul de la densité à partir de la réflectivité X, la contribution des lipides est soustraite au profil de densité électronique, alors que leur contribution ne peut pas être soustraite simplement dans le cas de l'ellipsométrie (voir III.4.2.3, p.67). Cela explique sans doute la différence observée. Ces deux valeurs constituent pour chaque technique une référence nous permettant de comparer les quantités de cadhérines adsorbées en fonction de la concentration en calcium présent dans la sous-phase.

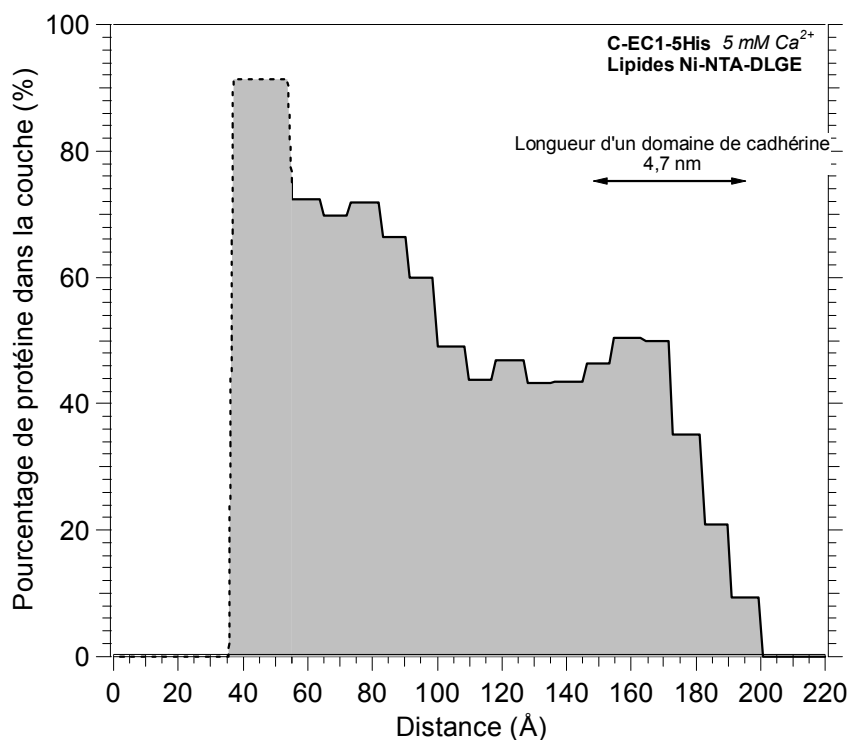


Figure 49 : Pourcentage de fragments C-EC1-5His dans la monocouche. La contribution des lipides au profil de densité électronique a été soustraite. Le pourcentage des cadhérine près de la tête polaire des lipides est probablement surestimé. Pour le calcul, la densité électronique du fragment C-EC1-5His est égale à $0,417 \text{ e.Å}^{-3}$.

Structure dans la monocouche

L'épaisseur totale de la monocouche de fragments C-EC1-5His que nous avons mesuré (16 nm) peut être comparée à la longueur des domaines extracellulaires de cadhérines mesurée ou évaluée dans la littérature (voir II.1.3.2, p.9). Un domaine extracellulaire mesure environ 4,7 nm, la longueur des cinq domaines alignés est donc de 23,5 nm comme indiqué sur la Figure 50 a). Cependant, dans la structure résolue par T. Boggon *et al.* [Boggon 2002], la longueur projetée sur un axe parallèle à la protéine est de 21 nm seulement en raison de la courbure de la molécule. Nos résultats peuvent être interprétés de plusieurs manières :

a) les protéines seraient inclinées en moyenne de 47° par rapport à la normale en prenant comme référence une longueur de 23,5 nm correspondant à une configuration rectiligne (Figure 50 b);

b) les protéines seraient inclinées en moyenne de 40° en considérant une longueur de 21 nm pour une cadhérine faiblement incurvée (Figure 50 c);

c) les protéines seraient fortement incurvées et non inclinées (Figure 50 d).

Ces angles d'inclinaison sont proches de l'angle d'inclinaison par rapport à la surface cellulaire de 40° estimé par T. Boggon *et al.* à partir de la structure du fragment C-EC1-5His présentée sur la Figure 6 (p. 12).

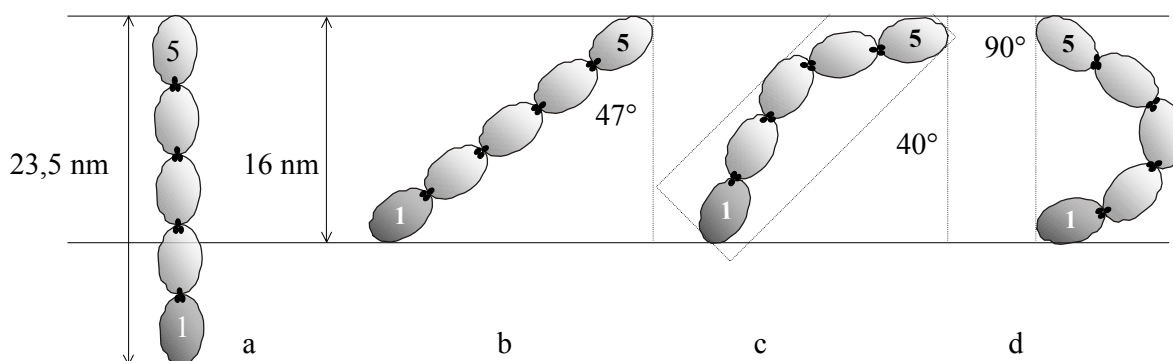


Figure 50 : Représentation schématique des inclinaisons possibles pour la C-cadhérine dans la monocouche. La cadhérine est orientée par la liaison du domaine 5 avec un lipide.

Des dimères cis?

La monocouche de fragments C-EC1-5His présente une inhomogénéité d'épaisseur puisque le profil de densité électronique est très rugueux entre la couche de protéine et la sous-phase. De plus, une sur-densité électronique est visible à une profondeur de 17 nm, juste avant que le profil ne diminue lentement vers la densité de l'eau. Cette région contient plus de 50% de cadhérine. Ces observations suggèrent que le domaine EC1 est incliné par rapport à la verticale, et par conséquent par rapport aux domaines précédents.

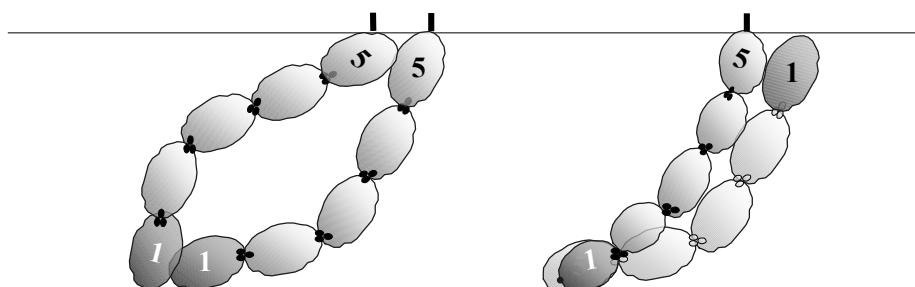


Figure 51 : Représentations schématiques des C-cadhérines ancrées aux lipides indiquant des géométries possibles d'interactions cis (à gauche) et trans (à droite).

T. Boggon *et al.* [Boggon 2002] ont estimé que les domaines EC1 et EC5 étaient presque à angle droit dans la structure calculée. Dans les modèles de B. Nagar *et al.* [Nagar1996] et de O. Pertz *et al.* [Pertz1999], les fragments EC1-2 forment un dimère *cis* dans lequel les domaines EC1 et EC2 de deux fragments voisins interagissent de manière croisée. L'épaisseur de la couche de fragments de C-cadhérine mesurée et les modèles *c* et *d* que nous exposons sont concordants avec ces travaux. Le profil de densité électronique de la monocouche du fragment C-EC1-5His suggère en effet que le domaine EC1, incliné par rapport aux autres domaines, pourrait être associé à son homologue d'une cadhérine voisine en un dimère *cis* comme le présente schématiquement la Figure 51 a). Finalement, en tenant compte de la structure de la partie extracellulaire résolue par T. Boggon *et al.*, le modèle le plus vraisemblable est la combinaison de courbure et d'inclinaison indiquée la Figure 50 c). Ainsi, les fragments de C-cadhérine qui se sont

ancrés aux lipides Ni-NTA-DLGE sont incurvés et pourraient former des complexes *cis* avec leurs voisins (Figure 51 a).

Ou des dimères trans?

S. Sivasankar *et al.* ont montré que les fragments extracellulaires de C-cadhérine de deux surfaces en vis-à-vis formaient des complexes adhérents selon trois profondeurs d'interdigitation (voir la Figure 9 du chapitre II et [Sivasankar2001a], [Sivasankar2001b]). Les C-cadhérines peuvent interagir lorsqu'elles sont totalement interdigitées, c'est-à-dire que le domaine 1 fait face au domaine 5, le domaine 2 au domaine 4, et les domaines 3 entre eux. Dans ce cas, le complexe mesure 25 nm. Elles interagissent aussi en formant un complexe de 32nm, les cadhérines étant dans ce cas décalées d'environ 1,5 domaines. Enfin, il se forme un troisième complexe de 40 nm de longueur où seuls les domaines 1 et 2 se recouvrent (voir Figure 9). L'épaisseur de la monocouche de fragments C-EC1-5His que nous avons mesurée par réflectivité X n'est pas compatible avec les deux types d'association mettant en jeu des fragments décalés, car ceux-ci sont bien plus long que les 16 nm observés. En revanche, il est possible que des complexes totalement interdigités soient ancrés en surface. Le profil de densité électronique présente un surplus de densité contenant plus de 60% de cadhérine près de la tête polaire des lipides. Les deux surplus de densité symétriques que nous observons pourraient correspondre à des domaines EC1 inclinés par rapport aux autres domaines, appartenant à des fragments de cadhérine interagissant en sens inverse comme le montre la Figure 51 b). Notons que, dans ce cas, un seul des fragments de cadhérine est lié à la monocouche de lipides par l'étiquette polyhistidine du domaine EC5.

En conclusion, l'observation du profil de densité électronique de la monocouche de référence de fragments C-EC1-5His ancrés aux lipides (Figure 48) montre que (1) les fragments C-EC1-5His forment une couche assez rugueuse de 16 nm et (2) cette couche est composée à ses extrémités de deux sur-densités composées de plus de 50 % de protéines.

A partir de ces premiers résultats, nous pouvons proposer plusieurs hypothèses en fonction de l'état oligomérique des fragments C-EC1-5His ancrés aux lipides et de l'alignement des domaines :

- les fragments de C-cadhérine seraient sous forme monomérique et les sur-densités seraient le reflet de l'orientation des fragments par rapport à la surface et peut-être des domaines extracellulaires (Figure 50 c et d).
- les fragments seraient sous forme de dimères *cis* et les régions plus denses seraient le reflet des conformations d'interaction (Figure 51 a).
- les fragments seraient sous forme de dimères *trans* formés par des fragments de C-cadhérine monomériques ou formant des dimères *cis* (Figure 51 b).

Dans la suite de cette section, nous étudions les effets de la variation de la concentration de calcium dans la sous-phase à l'état initial pour discuter ces hypothèses.

IV.2.2.2 Concentration en calcium "intermédiaire" de 0,5 à 2 mM Ca^{2+}

Premier cas : $[\text{Ca}^{2+}] = 2 \text{ mM}$

Nous considérons une monocouche de fragments C-EC1-5His incubés dans une solution tampon contenant à 2 mM de calcium sous les lipides Ni-NTA-DLGE. La Figure 52 présente les variations des angles ellipsométriques au cours de l'adsorption des fragments aux lipides. Une densité massique de surface de 9,4 mg/m² est calculée à partir des angles ψ et Δ à saturation. Cela représente 7% de masse adsorbée apparente en moins que dans le cas de la monocouche de référence incubée à 5 mM de calcium.

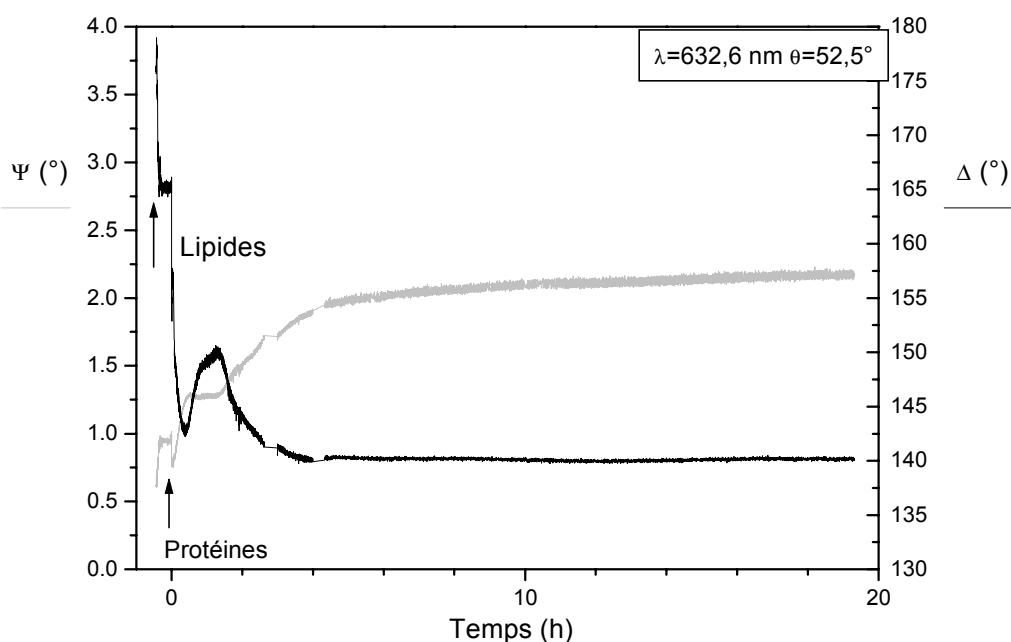


Figure 52 : Cinétique d'adsorption de la cadhérine C-EC1-5His aux lipides Ni-NTA-DLGE. Conditions Expérimentales : incidence 52,5°, $\lambda=633 \text{ nm}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 2 \text{ mM}$, $[\text{C-EC1-5His}] = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$. (ψ en clair, Δ en noir).

La cinétique d'adsorption est semblable à celle de la monocouche de référence puisqu'elle est composée de deux étapes : une adsorption rapide de protéines pendant 30 minutes suivi d'une évolution plus lente s'étalant sur dix heures. Le premier processus d'adsorption est plus lent car la concentration en fragments dans la sous-phase est réduit de moitié. Parmi l'ensemble des mesures effectuées avec injection du fragment C-EC1-5His par perçage de la monocouche de lipides, il a été rarement observé des courbes de cinétiques sans ce double processus d'adsorption. Comme nous l'avons discuté auparavant à propos de la monocouche de référence, ce phénomène est attribué à la forte concentration initiale en fragment. Un "accident" apparaît entre les temps 0,5 et 1,5 heures, correspondant vraisemblablement à des inhomogénéités de la couche adsorbée que la convection de surface fait circuler dans la zone du faisceau laser. Ce phénomène a été observé plusieurs fois.

Deuxième cas : $[Ca^{2+}] = 0,5 \text{ mM}$

Nous considérons une monocouche de fragments C-EC1-5His incubés sous les lipides Ni-NTA-DLGE dans une solution contenant $0,5 \text{ mM}$ d'ions Ca^{2+} . La cinétique d'adsorption des fragments à la monocouche lipidique est présentée sur la Figure 53. L'analyse d'une courbe ellipsométrique angulaire mesurée sur cette monocouche après 17,5 heures d'incubation indique une densité massique de surface de $8,7 \text{ mg/m}^2$, soit 13% de moins que dans le cas de la monocouche de référence, après 20 heures.

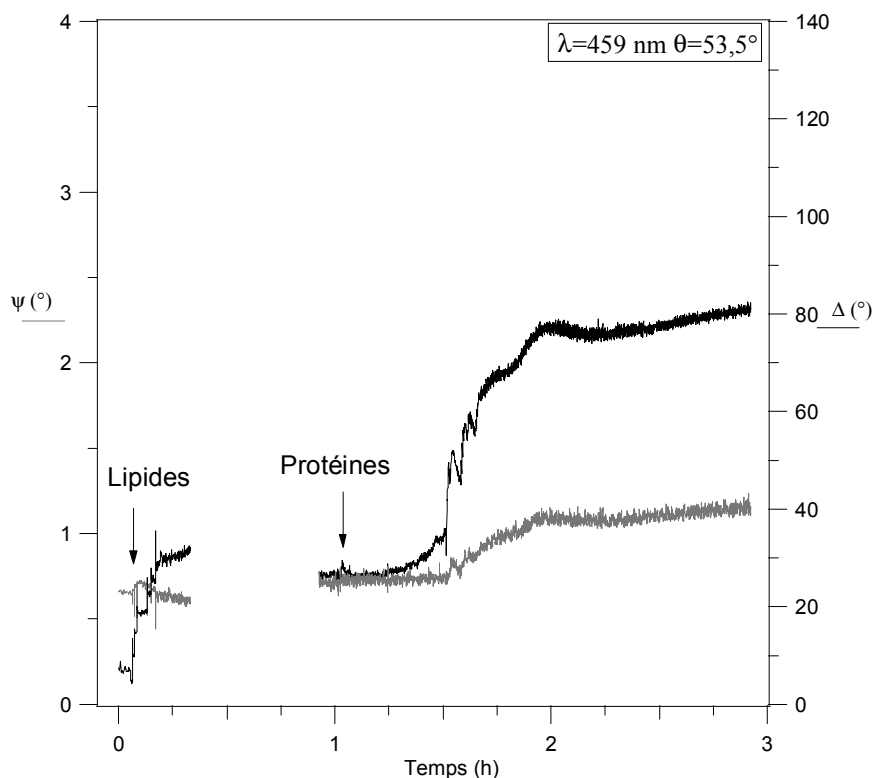


Figure 53 : Cinétique d'adsorption de la cadhérine C-EC1-5His aux lipides Ni-NTA-DLGE. Conditions Expérimentales : incidence $53,5^\circ$, $\lambda=459 \text{ nm}$, $[Ca^{2+}]=0,5 \text{ mM}$, $[C\text{-}EC1\text{-}5\text{His}]=0,5 \text{ }\mu\text{M}$. (ψ en clair, Δ en noir).

Réflectivité X

Nous avons effectué une mesure de réflectivité effectuée sur une monocouche de fragments C-EC1-5His cinq heures après leur injection sous les lipides Ni-NTA-DLGE dans une solution contenant 1 mM d'ions Ca^{2+} . La Figure 54 présente cette mesure ainsi que l'ajustement calculé par le programme *RefX*. Le profil de densité électronique déterminé à partir du calcul est présenté sur la Figure 55 a) et la proportion de cadhérine dans la monocouche est représentée sur la Figure 55 b).

Le profil de densité électronique correspondant à cette monocouche est comparé celui de la monocouche de référence (voir la Figure 48). La monocouche lipidique mesure $3,1 \text{ nm}$. La couche attribuée aux fragments de C-cadhérine s'étend sur 16 nm . Le profil de densité électronique est divisé en deux parties de $7,2 \text{ nm}$ et $7,8 \text{ nm}$ d'épaisseur et de densités électroniques comparables séparées

par un creux de densité au centre de la couche. A partir du profil de densité électronique, les proportions d'eau et de cadhérine au sein de la couche sont évaluées en moyenne à 49 % de protéine. La densité massique de surface de la couche de cadhérine est de 7,5 mg/m², soit une différence de 7,5 % par rapport à la couche de référence.

Discussion : une monocouche déjà structurée

D'après les travaux du groupe de J. Engel, les cadhérines sont susceptibles de former des complexes *trans* pour des concentrations en calcium supérieures à 1 mM [Pertz 1998]. Or, les mesures d'ellipsométrie et de réflectivité X que nous avons présentées indiquent une légère différence d'adsorption entre la couche de fragments de C-cadhérine de référence, incubées dans une solution riche en ions Ca²⁺ (5 mM), et celle incubée dans une solution plus pauvre en ions Ca²⁺ (1 ou 2 mM). Cette adsorption moindre correspond à une couche de fragments moins dense, qui pourrait être une couche "gonflée" en raison de moindres interactions.

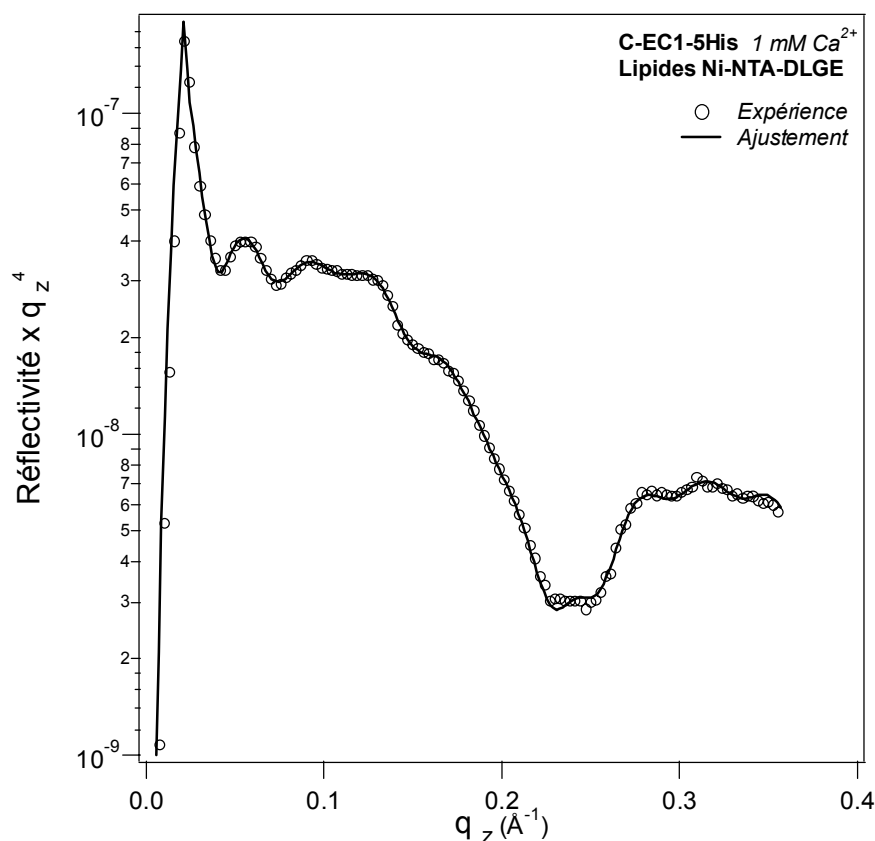


Figure 54 : Courbe de réflectivité expérimentale et ajustement. Conditions Expérimentales : [Ca²⁺]=1 mM, [C-EC1-5His] = 0,5 µM.

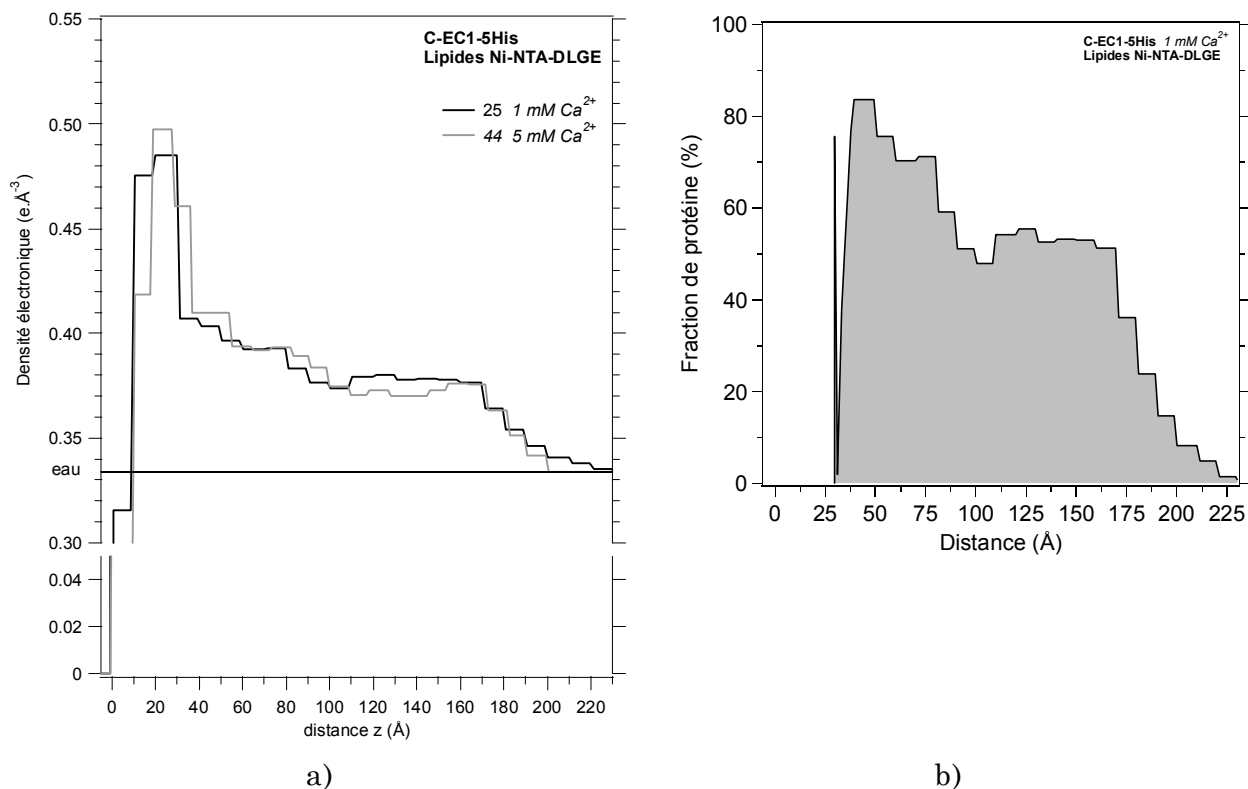


Figure 55 : a) Comparaison des profils de densité électronique des monocouches incubées avec 1 mM Ca^{2+} et 5 mM Ca^{2+} . b) Proportion de fragment C-EC1-5His dans la couche attribuée à la protéine pour la monocouche incubée à 1 mM Ca^{2+} .

IV.2.2.3 Faible concentration en calcium

Mesures ellipsométriques

Des fragments C-EC1-5His sont incubés dans une solution contenant 0,1 mM d'ions Ca^{2+} . L'adsorption des C-cadhérines à la couche de lipides Ni-NTA-DLGE est suivie par ellipsométrie et présentée sur la Figure 56. Des fluctuations plus importantes au cours des deux premières heures traduisent sans doute une plus grande inhomogénéité de la couche adsorbée dérivant sous le faisceau laser. Une mesure ellipsométrique angulaire a été effectuée 5,5 heures après l'injection des protéines, lorsque la saturation a été atteinte (Figure 57). L'analyse des angles ψ et Δ à saturation indique que la densité massique de surface est de 7,3 mg/m^2 , soit 27 % de moins que dans le cas de la monocouche de référence incubée avec 5 mM de Ca^{2+} pendant 20 heures.

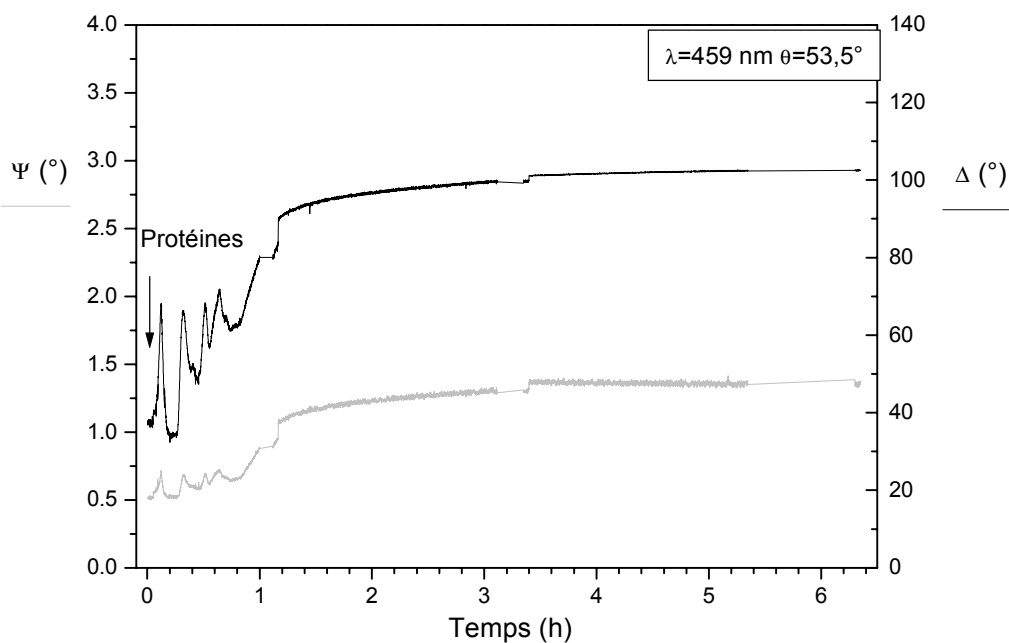


Figure 56 : Cinétique d'adsorption de la cadhérine C-EC1-5His aux lipides Ni-NTA-DLGE. Conditions Expérimentales : incidence $53,5^\circ$, $\lambda=459$ nm, $[Ca^{2+}]=0,1$ mM, $[C-EC1-5His]=0,5$ μ M. (ψ en clair, Δ en noir).

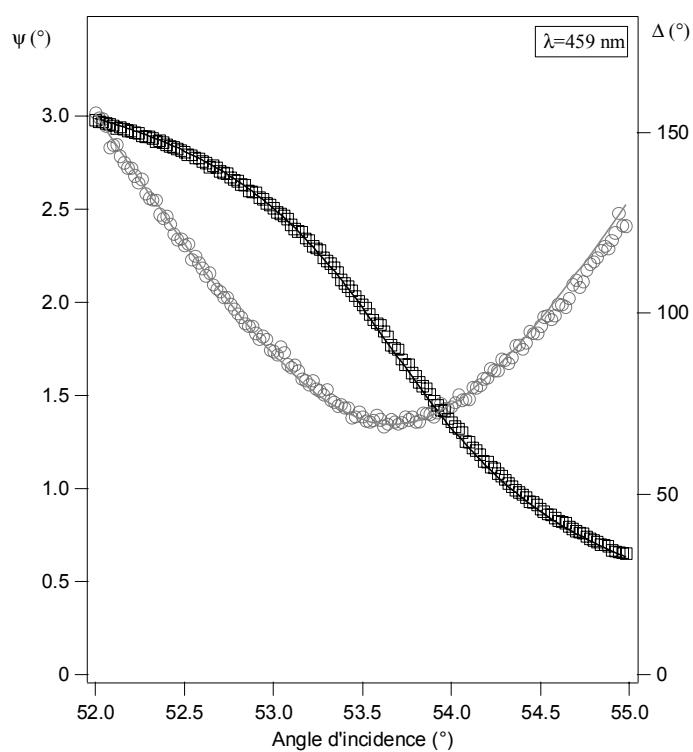


Figure 57 : Mesures ellipsométriques angulaire faite 6h30 après l'injection des protéines (ψ en \bullet gris, Δ en \blacksquare noir). Les symboles sont les points de mesure, les courbes sont calculées).

Réflectivité des rayons X

Une mesure de réflectivité sur une couche de fragments C-EC1-5His formée sous les lipides Ni-NTA-DLGE et incubée 2h30 dans une solution tampon à 0,1

mM de CaCl_2 est représentée sur la Figure 58 avec un ajustement calculé. D'après les données ellipsométriques, la monocouche est proche de son état d'équilibre à cet instant. Le profil de densité électronique présenté sur la Figure 59a indique que l'épaisseur de la couche de lipides est de 3 nm et l'épaisseur de la couche de fragment C-EC1-5His est d'environ 15 à 16 nm comme dans les cas précédents. L'analyse du profil de densité électronique montre que la couche attribué aux fragment de C-cadhérine est composée de 47 % de protéine. Une densité massique de surface de $7,2 \text{ mg/m}^2$ est calculée à partir du profil de densité électronique soit une déviation de 11,7% avec la monocouche de référence. La différence obtenue par ellipsométrie est, comme dans les cas précédents, plus importante que celle obtenue par réflectivité X.

Discussion : des monomères de C-cadhérine ?

Le profil de densité électronique est cependant relativement différent du profil de la monocouche de référence. La densité décroît lentement vers celle de l'eau dès une profondeur de 13 nm, alors que dans le profil de référence, la limite protéine-eau est plus nette, formant une marche. Nous attribuons cette caractéristique à une désorganisation partielle de la couche de protéine résultant des interactions entre des fragments de C-cadhérine. A faible concentration en calcium, les fragments extracellulaires de cadhérines n'interagissent pas et ne sont pas supposés former de complexes *trans* ou *cis*. Il est donc probable que d'avantage de fragments monomérique se sont ancrés aux lipides.

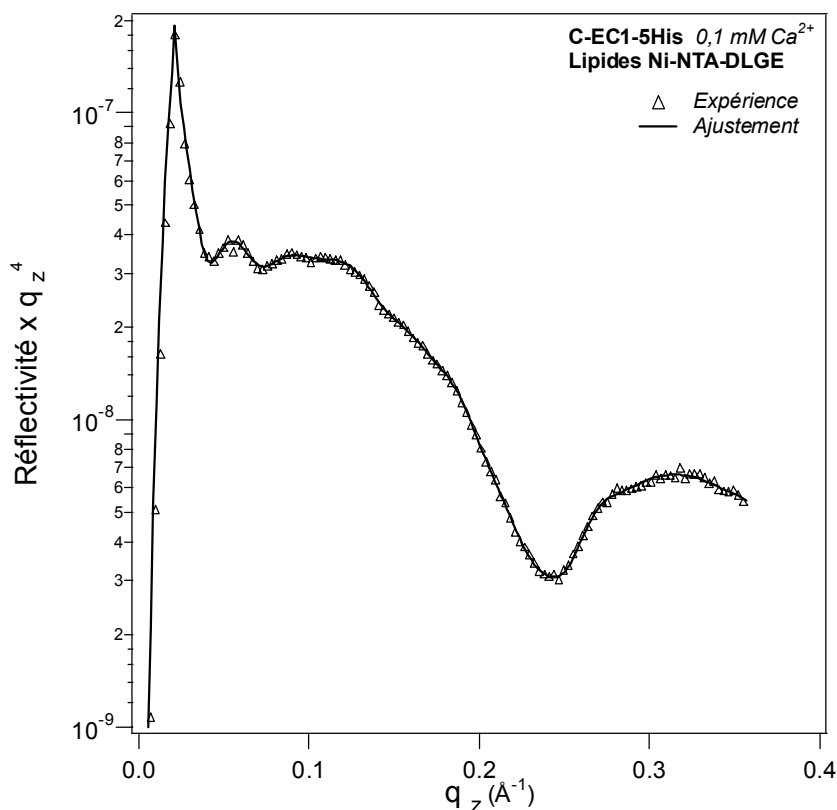


Figure 58 : Courbes de réflectivité expérimentales et ajustement. Conditions Expérimentales : $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1 \text{ mM}$, $[\text{C-EC1-5His}] = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$.

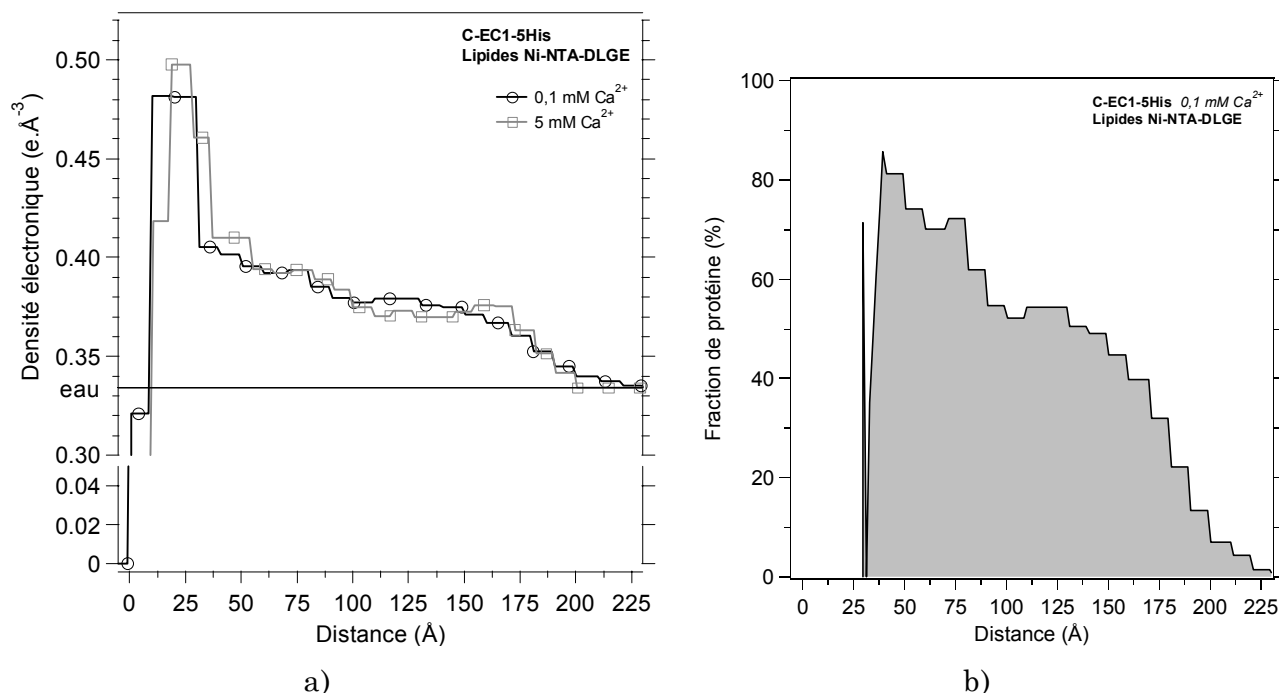


Figure 59 : a) Comparaison des profils de densité électronique des courbes avec 0,1 mM Ca²⁺ et 5 mM Ca²⁺. b) Proportion de fragment C-EC1-5His dans la couche attribuée à la protéine pour la monocouche incubée à 0,1 mM Ca²⁺.

Un modèle proposé pour décrire une telle couche est présenté sur la Figure 60. Les protéines ancrées peuvent avoir une grande variété d'orientation dans la couche les unes par rapport aux autres et plus de flexibilité entre les domaines dû au manque de calcium. Le profil de densité électronique est d'une part assez dense près des lipides auxquels sont liées les protéines, et d'autre part décroissant lentement vers l'eau à l'extrémité libre des protéines. Cela suggère que les protéines sont moins organisées latéralement dans la monocouche élaborée à partir d'une solution pauvre en calcium.

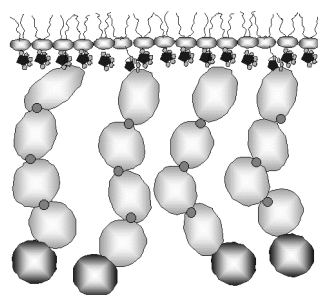


Figure 60 : Organisation schématique des C-cadhérines dans la monocouche pour une concentration en calcium faible (0,1 mM CaCl₂).

IV.2.2.4 Sous-phase sans calcium

Mesure ellipsométrique

Des fragments C-EC1-5His ont été injectés sous le mélange de lipides Ni-NTA-DLGE:DTPC (1:1), dans une sous-phase à concentration en calcium nulle²². La Figure 61 présente le suivi cinétique par ellipsométrie. Il indique que les fluctuations de densités sont observables pendant près de 10 heures et qu'une très faible quantité de protéine s'est ancrée aux lipides. L'analyse des données ellipsométriques révèle une masse adsorbée apparente de 3,4 mg/m². Cette valeur est faible et proche de la masse surfacique d'une monocouche de lipides calculées à partir de la tension de surface de la monocouche lipidique (environ 2 mg/m²). La contribution des lipides à la masse adsorbée est donc grande et il est probable que l'approximation de de Feijter n'est plus valable. Le calcul de la masse adsorbée apparente est peut-être faussé. Néanmoins, nous pouvons conclure que la monocouche de fragments C-EC1-5His incubés sans apport de calcium est très peu dense. Les fluctuations de densité observés sur le suivi cinétique sont le reflet d'une surface spatialement inhomogène révélée par les mouvements de convections à la surface de l'eau.

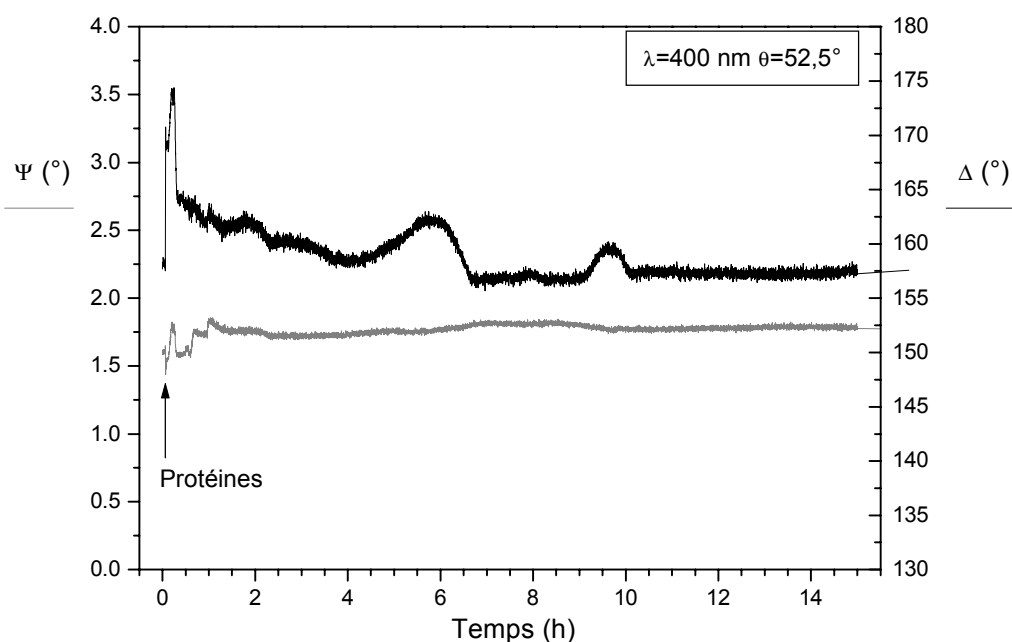


Figure 61 : Cinétique d'adsorption de la cadhérine C-EC1-5His à un monocouche du mélange de lipides Ni-NTA-DLGE:DTPC (1:1). Conditions Expérimentales : [C-EC1-5His]=0,5 μ M, [Ca²⁺]=0 mM, angle d'incidence 52,5°, λ =400 nm (ψ en clair, Δ en noir).

²² On n'atteint en fait jamais une concentration totalement nulle en calcium car le verre des récipients dans lesquels sont préparées les solutions relâche des ions Ca²⁺ dans les solutions.

Réflectivité des rayons X

La mesure de réflectivité effectuée 5,5 heures après l'injection des fragments sur une monocouche en présence d'une solution dépourvue de calcium, confirme qu'une quantité négligeable de protéines s'est fixée aux lipides. La courbe de réflectivité et un ajustement sont présentées sur la Figure 62 et le profil de densité électronique déterminé par l'ajustement est présenté sur la Figure 63. La courbe de réflectivité et le profil de densité électronique sont très proches de ceux des lipides Ni-NTA-DLGE seuls. L'ajustement est calculé par le programme *Parratt32* en utilisant un modèle à deux couches, c'est-à-dire le même que celui des lipides. Les paramètres des ajustements sont reportés dans le Tableau 11.

Les profils de densité électronique de la Figure 62 sont très similaires au niveau de la tête polaire des lipides. En revanche, les couches décrivant les chaînes aliphatiques sont différentes : cette couche est plus dense dans le cas de la monocouche avec cadhérine.

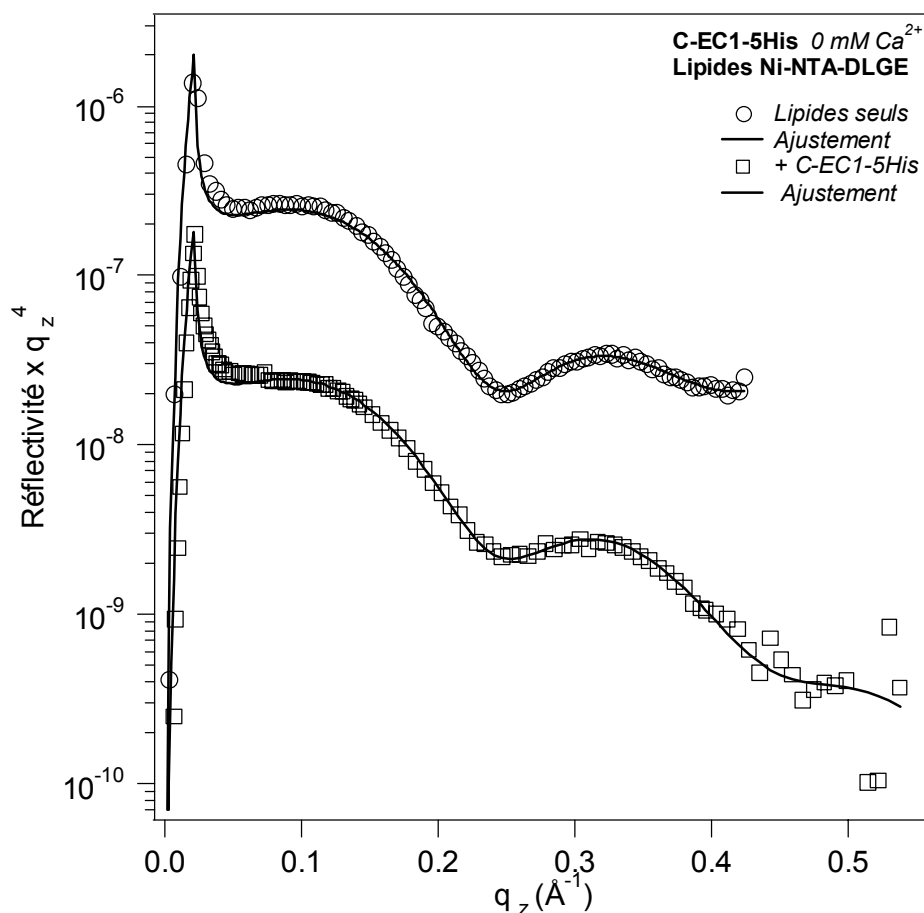


Figure 62 : Courbes de réflectivité expérimentales et ajustement comparés pour la monocouche de lipides Ni-NTA-DLGE seuls et celle où ont été incubés des fragments C-EC1-5His sans calcium. Conditions Expérimentales : $[\text{Ca}^{2+}] = 0 \text{ mM}$, $[\text{C-EC1-5His}] = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$. La courbe de réflectivité décrivant la monocouche de lipides ainsi que l'ajustement correspondant ont été multipliés par 10 pour plus de clarté, et un point expérimental sur trois est représenté sur la courbe de réflectivité. La monocouche de lipides seuls correspond à la courbe #C décrite dans la section IV.1.

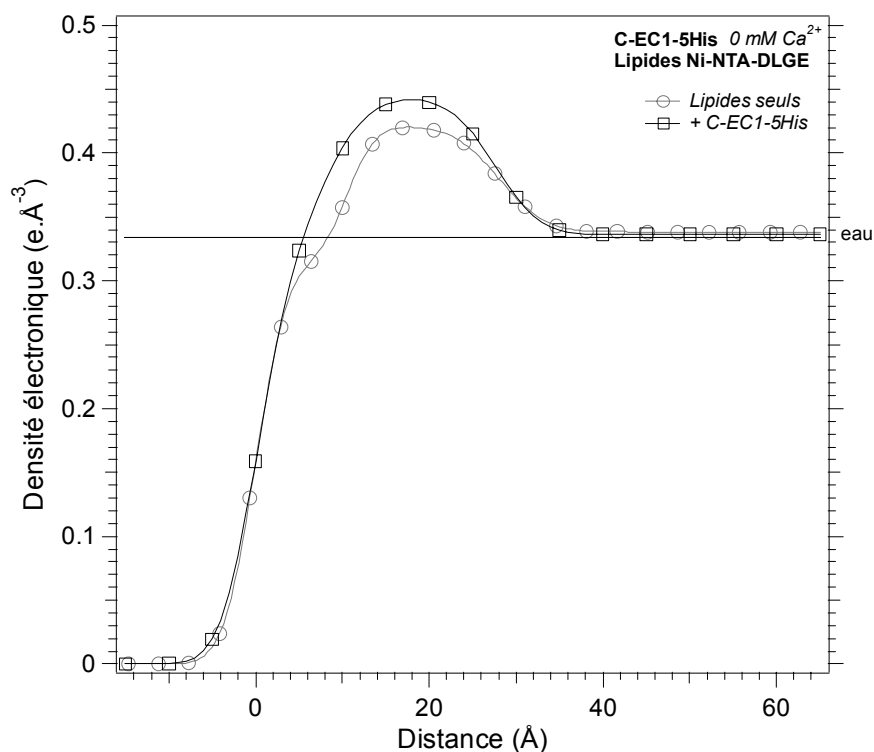


Figure 63 : Comparaison des profils de densité électronique des courbes de lipides Ni-NTA-DLGE seuls et avec C-cadhérine incubée dans une solution tampon ne contenant pas de calcium.

C-EC1-5His, 0 mM Ca ²⁺ Lipides Ni-NTA-DLGE		
Couche 1		
d (Å)	8,5	10,6
ρ (e.Å ⁻³)	0,292	0,321
σ (Å)	3,6	2,9
Couche 2		
d (Å)	19,3	17,5
ρ (e.Å ⁻³)	0,423	0,418
σ (Å)	5,2	2,6
Substrat		
ρ (e.Å ⁻³)	0,336	0,336
σ (Å)	4,4	4,2
Total		
d (Å)	27,8	28,1

Tableau 11 : Paramètres des couches utilisées pour l'ajustement d'une courbe théorique aux données expérimentales.

Discussion : dénaturation des C-cadhérines ?

Trois hypothèses peuvent être formulées pour expliquer les résultats obtenus pour la monocouche de fragments incubés en l'absence de calcium.

(1) Les protéines ne se seraient pas fixées aux lipides. Cela pourrait venir du fait qu'elles se sont dénaturées par manque de calcium et que l'étiquette polyhis-

tidine n'est plus accessible aux lipides. Cette hypothèse semble cependant contredite par la mesure d'ellipsométrie qui indique qu'une couche un peu plus dense qu'une monocouche de lipides seuls est présente à la surface de l'eau.

(2) Les protéines se seraient liées aux lipides tout en étant dénaturées, pouvant ainsi perdre leur conformation tridimensionnelle et se déplier. Elles pourraient former une couche fine inhomogène sous les lipides. La mesure de réflectivité X ne supporte pas vraiment cette hypothèse puisque la courbe de réflectivité X est ajustée par un modèle avec seulement deux couches.

(3) La dénaturation de la protéine peut l'amener à exposer en surface des acides aminés hydrophobes normalement repliés au sein de la structure. Dans ce cas, la protéine peut entrer en compétition avec les lipides à la surface de l'eau. Cette hypothèse pourrait expliquer à la fois les courbes ellipsométriques (couche inhomogène et peu dense) et de réflectivité X (légère sur-densité au contact de l'air).

Dans leur étude des interactions entre les fragments C-EC1-5His, S. Sivasankar *et al.* ont préparé des monocouches de fragments monomériques qui avaient incubé pendant 30 minutes dans une solution contenant l'agent chélatant d'ions divalents EDTA [Sivasankar2001b]. Ensuite, les mesures de force entre deux surfaces en vis-à-vis recouvertes de monomère de C-EC1-5His étaient faites en présence de 2 mM de calcium afin d'entraîner de nouveau des interactions entre les fragments de C-cadhérine. Ainsi, l'incubation de fragments C-EC1-5His dans un tampon contenant de l'EDTA pendant 30 minutes semble suffisante pour réduire les interactions entre cadhérines et obtenir des monomères. Par ailleurs, Rothen-Rutishauser *et al.* ont montré que une incubation de cellules adhérentes pendant 30 minutes dans un tampon contenant de l'EGTA dissocie les jonctions cellulaires et que une addition de calcium permet de rétablir les interactions [Rothen-Rutishauser 2002]. Ces expériences indiquent que l'appauvrissement initial de la solution par l'effet de l'agent chélatant n'a pas dénaturé les fragments de cadhérine.

Cependant, dans notre étude, les fragments C-EC1-5His ont incubé pendant 4 heures dans une solution tampon dépourvu de calcium. Il semble donc que la durée d'incubation puisse jouer un rôle important dans la dénaturation des fragments. En effet, l'incubation pendant plusieurs heures des fragments C-EC1-5His dans une solution tampon sans calcium ne conduit pas à la formation d'une monocouche ancrée aux lipides.

Nous pouvons conclure que le manque de calcium dans la solution a un effet dramatique sur les fragments de cadhérine constituant la monocouche. Pour étudier les effets du calcium sur les cadhérines, il est donc préférable de se limiter à une concentration minimale de calcium (0,1 mM par exemple). Cela est tout à fait comparable avec les observations de O. Pertz *et al.* qui indiquent que la concentration minimale en calcium nécessaire au repliement des domaines extracellulaires de cadhérine est de 0,05 mM [Pertz1998].

IV.2.2.5 Evolution de la structure des fragments de C-cadhérine en fonction de la concentration de la sous-phase en calcium

Le Tableau 12 et la Figure 64 rassemblent les valeurs de densité massique de surface que nous avons obtenues par ellipsométrie et par réflectivité X. La colonne marquée "%" indique la différence de masse adsorbée apparente dans la monocouche à un instant donné, par rapport à la masse adsorbée dans la monocouche de référence (5mM Ca^{2+} , voir IV.2.2.1). Ces travaux ont été consignés dans un article [Martel 2002].

La densité des monocouches de fragments C-EC1-5His ancrés aux lipides diminue globalement lorsque la concentration en calcium de la sous-phase est réduite. La différence de densité massique de surface mesurée par ellipsométrie est plus importante que par réflectivité X, notamment à 0,1 mM de calcium. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'observation d'une densité surfacique moindre lorsque la concentration en calcium de la sous-phase est abaissée.

[Ca ²⁺](mM)	Ellipsométrie		Réflectivité X	
	Γ_e (mg/m ²) (protéine+lipide)	%	Γ_{RX} (mg/m ²) (protéine)	%
5	10,1		8,1	
2	9,4	7		
1			7,5	7,5
0.5	8,7	13		
0.1	7,3	27	7,2	11
0	3,4*		~0	

Tableau 12 : Récapitulation des valeurs de densité massique surfacique des couches de C-cadhérines en fonction de la concentration de calcium en sous-phase. Γ_e : masse obtenue par ellipsométrie, Γ_{RX} : obtenue par réflectivité X. Les pertes sont les pourcentages par rapport à la couche référence (5 mM Ca^{2+}). Lipides Ni-NTA-DLGE, sauf * mélange Ni-NTA-DLGE:DTPC (1:1).

Les fragments extracellulaires de cadhérine n'interagissent pas en l'absence de calcium ([Takeichi, 1991], [Pertz 1998]). Dans le cas de l'expérience effectuée sans adjonction de calcium dans la sous-phase, les fragments, qui forment la monocouche en étant ancrés aux lipides par leur extrémité C-terminale (domaine EC5), sont donc libres à leur extrémité N-terminale (domaine EC1). Ils occupent de ce fait une surface plus grande. La monocouche est par conséquent moins dense et il peut en résulter des inhomogénéités d'épaisseur et de densité. Les profils de densité électronique que nous avons observés confirment que les monocouches de fragments de C-cadhérine formées en présence d'une solution pauvre en calcium sont plus rugueuses à l'interface protéine-eau.

O. Pertz *et al.* indiquent qu'au-dessus de 1 mM, les cadhérines forment des dimères *trans* et que la proportion de dimères augmente lorsque la concentration en calcium est élevée à 2 mM et 5 mM [Pertz 1998]. Nous avons effectivement observé que la densité des couches augmente lorsque la concentration en calcium augmente de 0,5 mM à 5 mM.

Les fragments C-EC1-5His sont conservés dans une solution tampon contenant une forte concentration en calcium (2 mM). Dans cette solution initiale, il

existe un équilibre entre les formes monomérique et dimérique des fragments dont la proportion varie avec la concentration (voir chapitre II). La concentration initiale en fragment équivaut à une proportion d'environ 40% de dimère et 60% de monomère [Chappuis-Flament 2001]. Cela signifie que les solutions comportent toujours un grand nombre de monomères, même à forte concentration en calcium. La comparaison des masses adsorbées apparentes déterminées par ellipsométrie montre qu'entre la couche de référence et celle formée à 0,1 mM de calcium, une différence de masse maximale de 27 % est observée, ce qui pourrait correspondre à une fraction massique initiale de 54% constituée par des dimères *trans*.

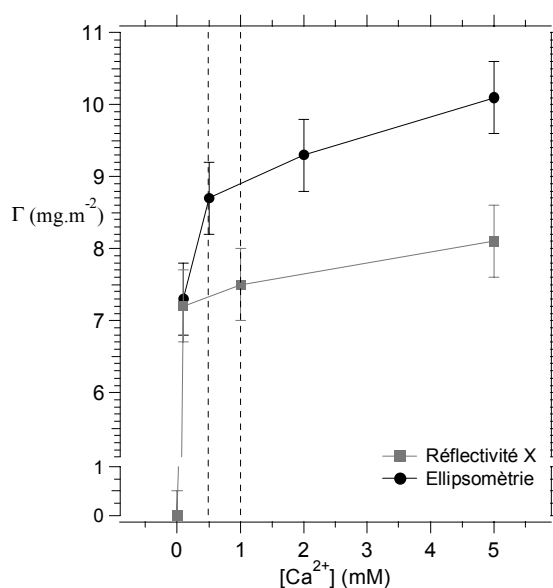


Figure 64 : Densité massique apparente des couches de C-cadhérines en fonction de la concentration de calcium en sous-phase déterminée par réflectivité X et ellipsométrie. Les limites de concentration en calcium pour interaction entre cadhérine déterminées par O. Pertz *et al.* sont indiquées à 0,5 mM et 1 mM. Une barre d'erreur de 0,5 mg/m² est indiquée, correspondant à l'incertitude sur l'analyse des résultats d'ellipsométrie (voir Chapitre I).

L'adsorption des fragments à la monocouche lipidique peut généralement être décomposée en deux régimes, dont le premier est très rapide et le second plus lent. A la fin de la première étape, une grande partie des fragments s'est ancrée aux lipides. La monocouche se réarrangerait lentement lors de la deuxième étape. Les monocouches que nous avons formées sont donc a priori composées initialement de monomères et de dimères. Il n'existe aucune indication sur l'orientation des fragments dans ces complexes, les dimères pourraient être *trans* ou *cis*. Les profils de densité électronique obtenus dans le cas d'une concentration élevée en calcium (supérieure à 1 mM) suggèrent qu'il existe des interactions entre les fragments. Il est donc probable que des dimères s'ancrent aux lipides.

Par ailleurs, les monocouches formées à faible concentration en calcium (0,1 mM) paraissent peu organisées, et sont moins dense. Lors de ces expériences, les dimères présents en solution initialement pourraient se greffer aux lipides avant de se dissocier en monomères. Dans l'hypothèse où ces dimères seraient parallèles (*cis*), l'appauvrissement de la solution en calcium, en supprimant les interac-

tions entre les fragments, aurait comme effet une désorganisation de la monocouche qui se traduirait par une rugosité plus importante à l'interface protéine-eau. Dans l'hypothèse où les complexes seraient antiparallèles (*trans*), une partie des fragments impliqués dans les dimères ancrés aux lipides pourrait se dissocier et être relâchés en solution. Certains pourraient alors réintégrer la monocouche en interagissant avec l'ion nickel des lipides

Finalement, ces résultats montrent que les cadhérines réagissent au calcium, donc qu'elles restent actives dans la monocouche. Cela est crucial pour étudier les interactions adhérentes. Dans la section suivante, nous montrons qu'il est possible de dissocier des complexes cadhérines ancrés en surface.

IV.2.3 Dissociation de complexes de C-cadhérines

La section précédente s'est intéressée à des états stationnaires des couches de fragments C-EC1-5His. Cette étude nous a permis d'évaluer les densités de surface des monocouches en fonction de la concentration en calcium dans la sous-phase. Nous avons montré qu'en présence de calcium, les monocouches sont plus denses et plus structurées. Elles présentent un profil de densité électronique formant une interface abrupte avec l'eau et possédant deux sur-densités. Ces sur-densités pourraient être attribuées à des domaines extracellulaires aux extrémités plus inclinés que les domaines centraux, reflétant des interactions entre les fragments. Il est cependant difficile de conclure sur l'orientation des fragments formant des complexes ancrés aux lipides.

L'objectif de cette section est de déterminer si les complexes de fragments C-EC1-5His composant la monocouche se présentent sous la forme de dimères antiparallèles ou parallèles. Pour cela, nous cherchons à dissocier des complexes de fragments C-EC1-5His greffés à une monocouche lipidique. A partir d'une monocouche de fragments formée en présence d'une solution riche en calcium, nous appauvrissons la sous-phase en calcium soit par dilution de la sous-phase avec de l'eau, soit par ajout d'un chélatant d'ions divalents (EGTA ou EDTA). La perte de masse à la surface permet d'évaluer le pourcentage de dimères (ou de multimères) anti-parallèles en surface. Des monocouches ont été élaborées en présence de solutions contenant initialement des concentrations en calcium variables pour tenter de comprendre le rôle du calcium sur la formation des complexes.

IV.2.3.1 Dilution de la sous-phase

Mesure ellipsométrique : dilution $[Ca^{2+}]$ de 2 mM à 0,1 mM

Nous avons élaboré une monocouche de fragment C-EC1-5His en présence d'une solution contenant initialement 2 mM d'ions calcium. Une mesure ellipsométrique angulaire a été collectée après 19h30 d'incubation. La masse adsorbée apparente de fragments était de 9,4 mg/m². La sous-phase a ensuite été totalement changée par circulation à l'aide de la pompe péristaltique d'une solution tampon identique à la précédente, mais ne contenant pas de protéine et contenant 0,1 mM d'ions calcium. Une seconde mesure a été effectuée 23h30 après l'échange de la sous-phase. L'analyse des courbes ellipsométriques angulaires

indique que la masse adsorbée apparente est de 8,0 mg/m². Ainsi, l'appauvrissement en calcium fait diminuer la masse adsorbée de 15 %. La Figure 65 présente les variations des angles ellipsométriques ψ et Δ en fonction de l'angle incident avant et après la dilution de la sous-phase.

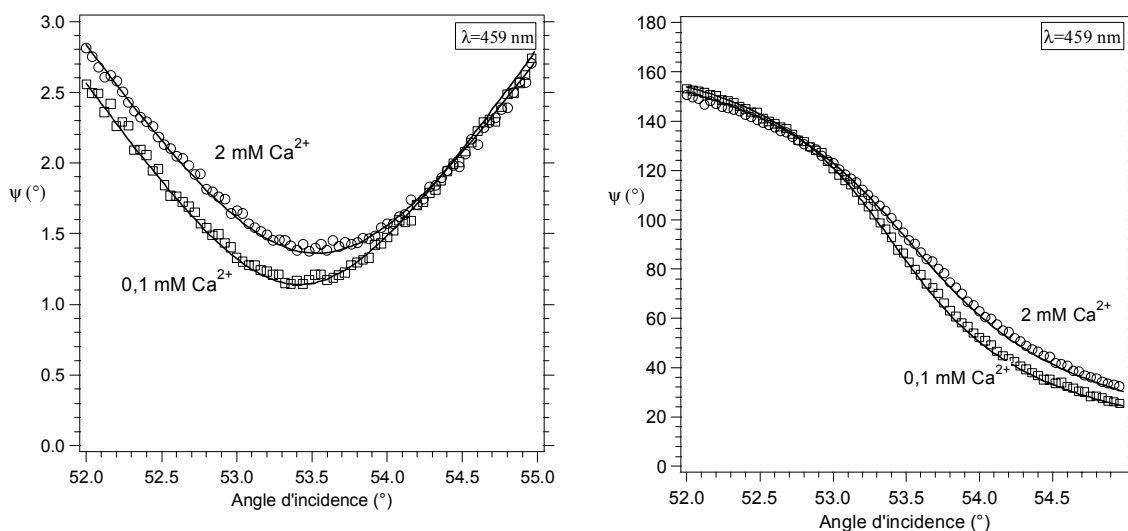


Figure 65 : Chute de la masse adsorbée observé par mesure d'ellipsométrie angulaire lors de la diminution de la concentration en calcium de 2 mM (triangles et courbe noirs) à 0,1 mM Ca²⁺ (carrés et courbe gris). Les données expérimentales sont représentées par des symboles (un point sur deux est représenté) et les courbes correspondent aux calculs. Conditions Expérimentales : [C-EC1-5His] = 0,5 μM, lipides Ni-NTA-DLGE.

Réflectivité des rayons X : [Ca²⁺] de 5 mM à 0 mM

La structure perpendiculaire à la surface d'une monocouche de fragments C-EC1-5His a été étudiée à partir de mesures de réflectivité X. Une monocouche de fragments C-EC1-5His a été élaborée sur une solution tampon contenant initialement 5mM d'ions calcium. La sous-phase a ensuite été totalement changée avec une solution tampon identique à la précédente, mais ne contenant ni ions calcium, ni protéines, par circulation de solution à l'aide de la pompe péristaltique. Les deux courbes de réflectivité présentées sur la Figure 66 sont des moyennes de courbes mesurées (a) après une incubation de 5h à 20h dans la solution riche en calcium et (b) après une incubation de 9h dans la solution sans calcium. Les oscillations présentes sur la courbe (a) indiquant la présence de la protéine ont quasiment disparu sur la courbe (b). Les profils de densité électronique correspondant aux ajustements sont représentés sur la Figure 67. Leur comparaison indique que la densité électronique de la monocouche incubée après le changement de la sous-phase est plus faible. La densité massique de surface des monocouches est de 7,9 mg/m² pour la monocouche incubée en présence de calcium et de 6,9 mg/m² pour celle incubée sans calcium, ce qui représente une différence de 13%.

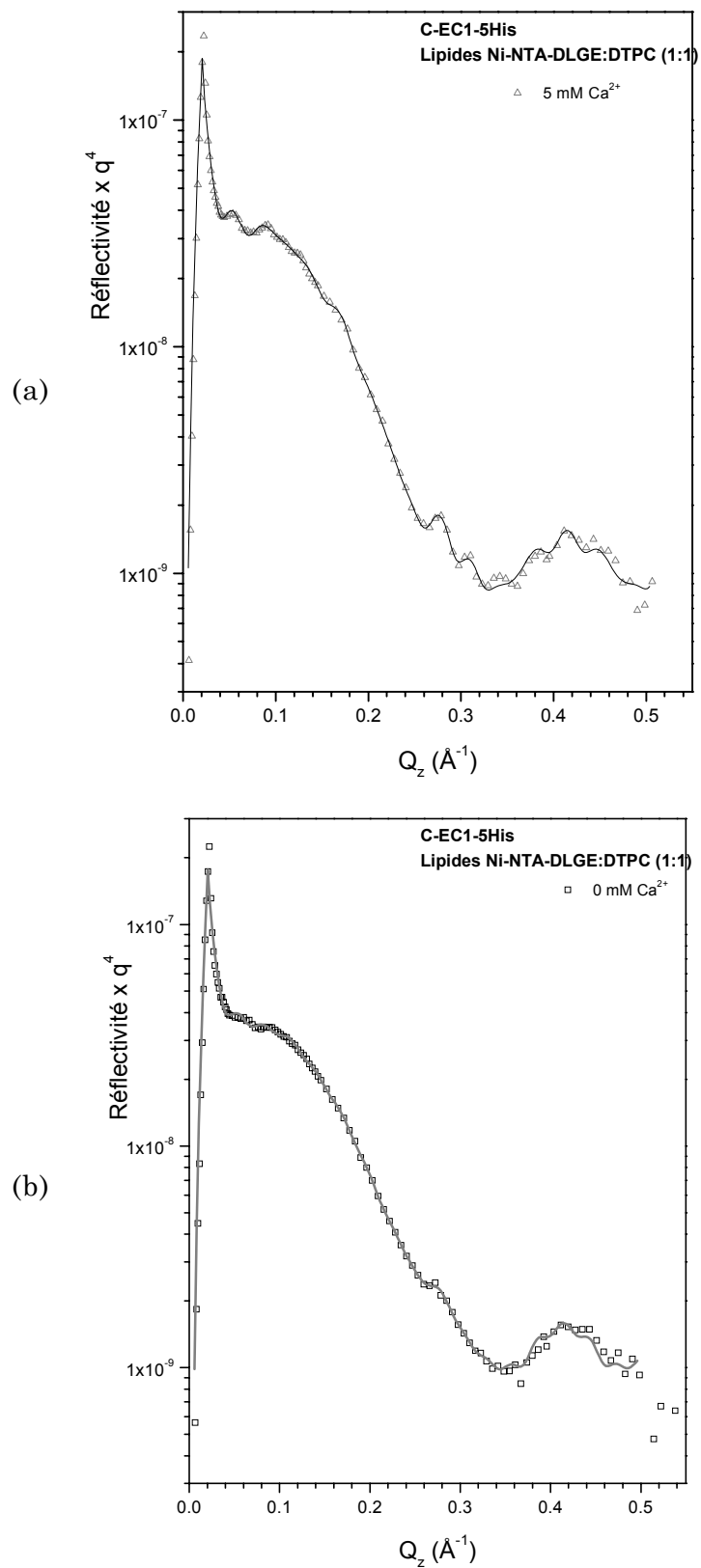


Figure 66 : Courbe de réflectivité avant (a) et après (b) le rinçage de la sous-phase (données expérimentales symboles, courbe calculée en trait plein). Conditions Expérimentales : $[\text{C-EC1-5His}] = 0,5 \mu\text{M}$, lipides Ni-NTA-DLGE:DTPC (1:1).

Les deux profils de densité électronique indiquent que l'épaisseur de la monocouche de fragments C-EC1-5His est de 16 nm. Une sur-densité est visible près de l'interface entre l'eau et la monocouche de protéine sur le profil de la monocouche élaborée en présence de calcium. Le profil de densité électronique de la monocouche après dilution décroît très lentement vers la densité de l'eau. Or, comme le montre l'agrandissement des courbes à petits vecteurs de diffusion (Figure 68), l'ajustement de la courbe "sans calcium" exagère les amplitudes des oscillations. Le programme d'ajustement *RefX* obtient un bon accord entre les courbes calculées et expérimentales sur l'ensemble des données, mais il apparaît que la densité globale de la couche "sans calcium" est surestimée. Le programme d'ajustement calcule une courbe de réflectivité sur laquelle ces oscillations sont lissées et le profil de densité électronique correspondant est très "rugueux". Il est probable que la densité réelle de la monocouche de fragments après la dilution de la sous-phase est beaucoup moins importante.

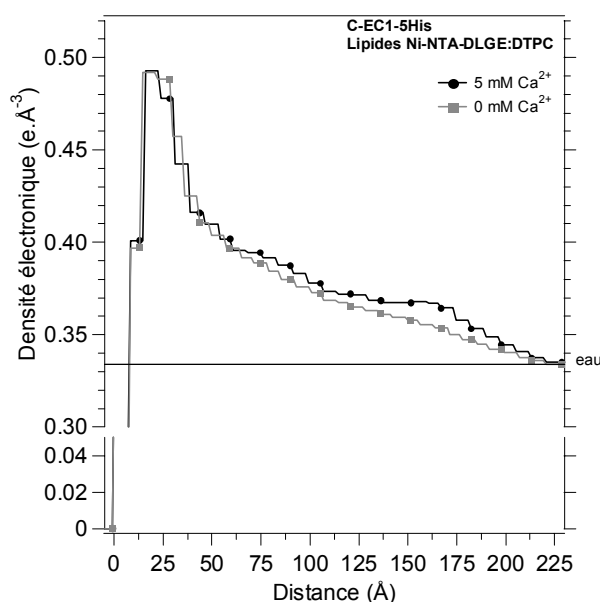


Figure 67 : Profils de densité électronique correspondant aux ajustements des deux courbes présentés sur la Figure 66 (a) et (b).

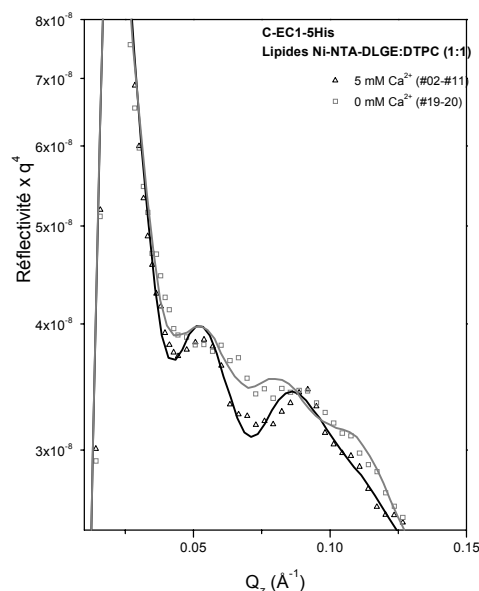


Figure 68 : Agrandissement des courbes de réflectivité de la Figure 66 (a) et (b) aux petits angles.

Réflectivité X : $[Ca^{2+}]$ de 1 mM à 0,1 mM

Une seconde expérience similaire de dilution de la sous-phase a été effectuée. Dans ce cas, la concentration finale de la sous-phase en ions calcium est de 0,1 mM. Les fragments C-EC1-5His ont incubé pendant 5h20 dans une solution contenant 1 mM de calcium, puis 2h40 après la dilution conduisant à une concentration de 0,1 mM de calcium. Les courbes de réflectivité mesurées sur ces monocouches, ainsi que les ajustements calculés par le programme *RefX* sont

présentées sur la Figure 69. Les profils de densité électronique déterminés par les ajustements sont présentés sur la Figure 70.

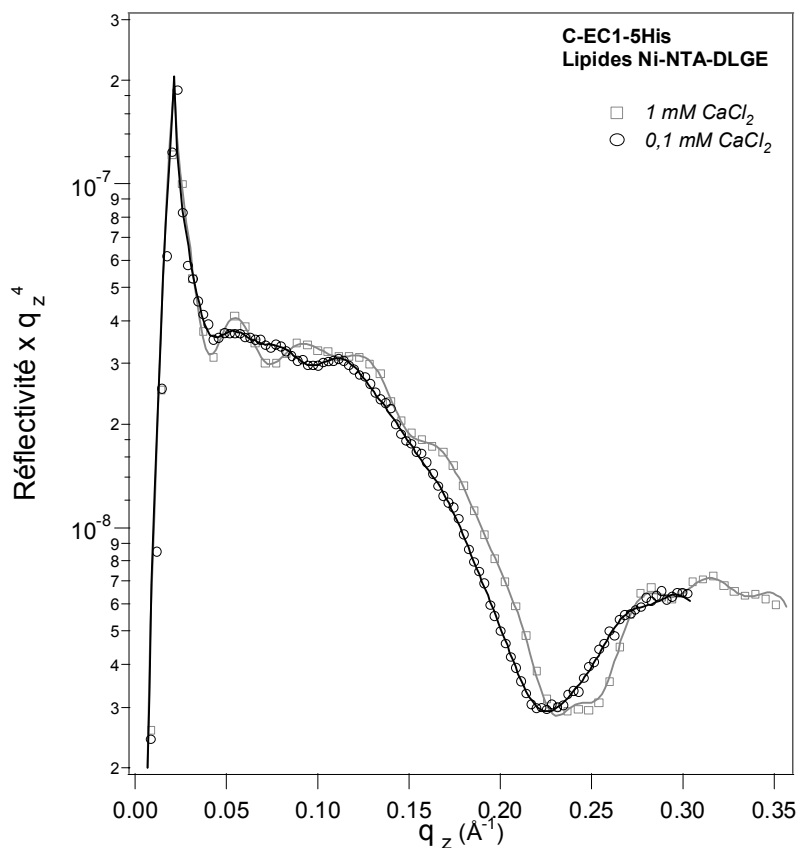


Figure 69 : Courbes de réflectivité avant et après dilution de la sous-phase de 1 mM à 0,1 mM CaCl_2 . Conditions Expérimentales : $[\text{C-EC1-5His}] = 0,5 \mu\text{M}$, lipides Ni-NTA-DLGE.

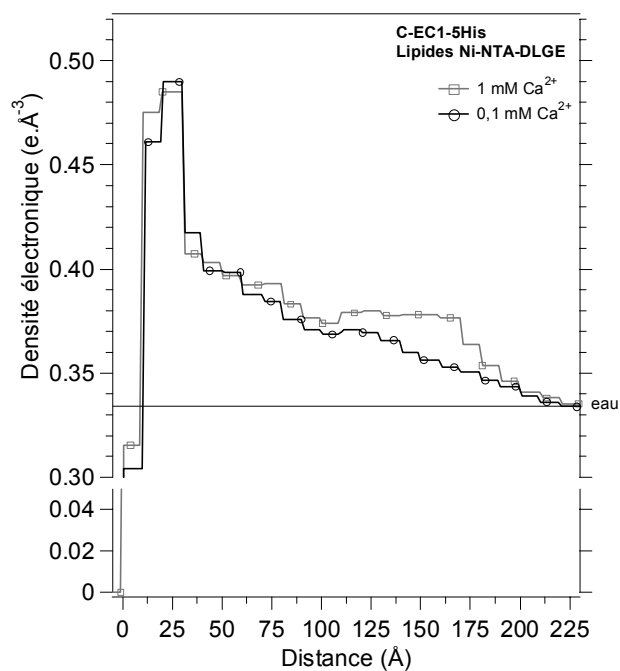


Figure 70 : Profils de densité électronique correspondant aux ajustements de la Figure 69.

L'analyse des profils de densité électronique indique que la quantité de fragments C-EC1-5His formant la monocouche incubée dans la solution contenant 1 mM de calcium est de 7,5 mg/m². Elle est de 6,4 mg/m² après la dilution de la sous-phase. La perte de masse est donc de 15% au minimum.

Discussion : interactions entre fragments extracellulaires de C-cadhérine

Les effets de la dilution du calcium sur les fragments extracellulaires de C-cadhérine ont été étudiés. Le Tableau 13 rassemble les valeurs mesurées de densités des couches de C-cadhérines avant et après dilution de la sous-phase pour diminuer la concentration en calcium. Les mesures ellipsométriques semblent surévaluer les densités de surface, comme nous l'avons remarqué dans la section précédente.

Entre 13% et 15% de la masse greffée initialement à la monocouche de lipides en présence d'une solution riche en calcium est perdue lors de la dilution de la sous-phase en calcium. De plus, la couche de fragments extracellulaires de C-cadhérine est moins structurée, comme l'indiquent les profils de réflectivité des rayons X.

[Ca ²⁺]	Ellipsométrie			Réflectivité X					
		Γ_e (mg/m ²)	%		Γ_{RX} (mg/m ²)	%		Γ_{RX} (mg/m ²)	%
Elevée	2 mM	9,4		1 mM	7,5		5 mM	7,9	
Faible	0,1 mM	8,0	-15	0,1 mM	6,4	-15	0 mM	6,9	-13

Tableau 13 : Comparaison des densités massiques des couches de C-cadhérines après diminution de la concentration en calcium de la sous-phase.

Tout d'abord, le passage à une concentration nulle en calcium apparaît moins dramatique que dans les mesures précédentes où les fragments étaient incubés dans une solution sans calcium (voir le paragraphe IV.2.2.4). Nous avons observé en effet dans ce cas que les fragments ne s'étaient pas liés aux lipides. Ici, après dilution de la sous-phase, seuls 13% de la masse de fragments ancrés initialement aux lipides se décrochent. Ceci semble souligner les différences entre la concentration de molécules en surface et la concentration en volume, c'est-à-dire entre la monocouche de protéines et la sous-phase. En effet, il est possible que la compacité de la couche empêche les fragments de cadhérine de se dissocier alors qu'ils l'auraient fait en solution. Lorsque les fragments de cadhérine sont ancrés aux lipides à forte concentration en calcium, la couche est dense et les sites de fixation du calcium apparaissent protégés. Il est possible en outre que l'effet de la dilution du calcium dans la sous-phase est plus lent en surface que le temps d'incubation que nous avons laissé à la couche.

En revanche, l'appauvrissement de la concentration en calcium de la sous-phase entraîne un changement du profil de densité électronique important. Cette différence est plus grande que celle observée entre les profils respectifs des monocouches formées à forte ou faible concentration en calcium. La Figure 71 compare les profils de densité électronique déterminés pour la monocouche de fragments C-EC1-5His formée en présence d'une solution riche en calcium puis di-

luée (cas présenté sur la Figure 70), et une monocouche formée en présence d'une solution pauvre en calcium (cas présenté sur la Figure 59). La perte de masse est nettement visible dans le cas de l'expérience de dilution. La différence observée entre les deux profils de monocouches incubées en présence des solutions contenant 1 mM et 0,1 mM de calcium, de moindre importance, se situe au niveau de la sur-densité observée près de l'interface eau-protéine. Cette différence peut être interprétée comme une désorganisation partielle de la monocouche incubée en présence d'une solution pauvre en calcium, et une dissociation de complexes formés par les fragments de cadhérine.

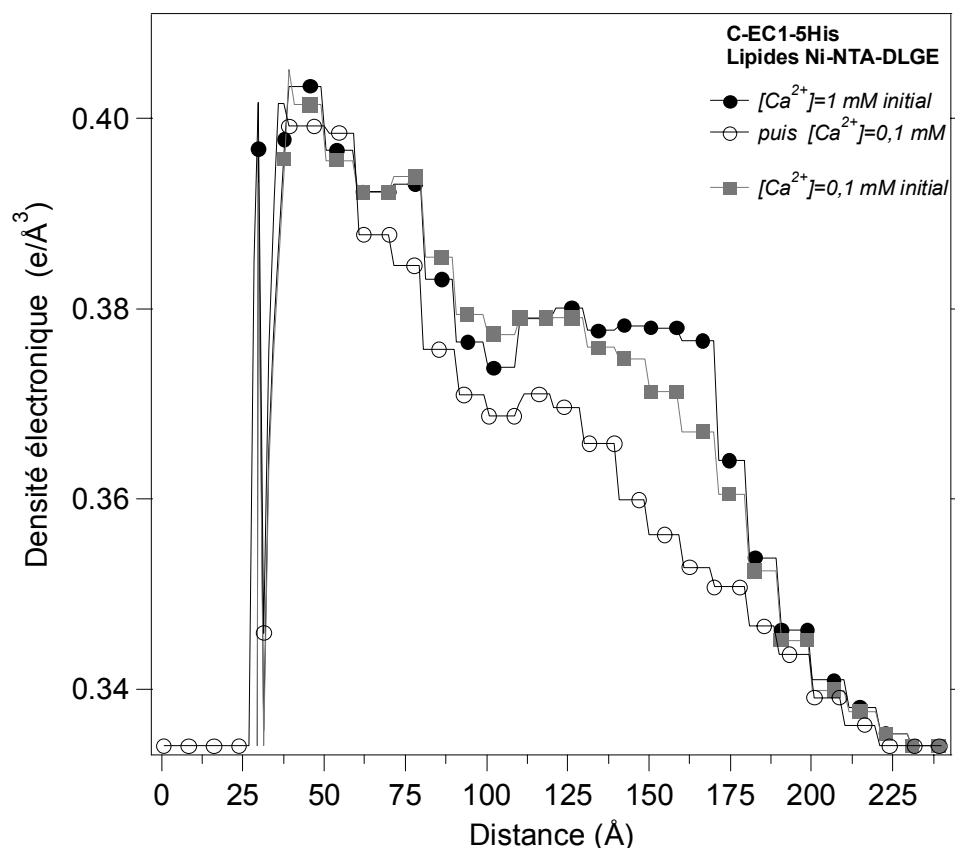


Figure 71 : Comparaison des profils de densité électronique déterminés pour les monocouches de fragments C-EC1-5His formées en présence d'une solution contenant 1 mM d'ions calcium abaissée à 0,1 mM et formées en présence d'une solution contenant 0,1 mM de calcium. La contribution des lipides a été soustraite.

Les fragments incubés dans une solution contenant 0,1 mM de calcium s'ancreraient aux lipides sous une forme majoritairement monomérique, une petite partie des fragments seulement étant impliquée dans des complexes. La monocouche formée serait alors constituée de fragments ne pouvant pas interagir à cause de l'absence de calcium. Une telle couche pourrait être assez dense mais de structure plus désordonnée présentant donc un profil rugueux près de l'interface entre les protéines et l'eau.

Lors de la dilution de la sous-phase contenant initialement 1 mM de calcium, les changements dans la monocouche sont plus dramatiques. Les fragments incubés dans une solution contenant 1 mM de calcium seraient liés à la monocouche de lipides sous forme majoritairement dimérique. L'appauvrissement de la

sous-phase en calcium entraînerait une dissociation des complexes *trans* de fragments de cadhérine et cela se traduirait par une chute de densité surfacique. Les fragments restant en surface (85 % de la masse initiale) n'interagiraient pas et auraient plus de place au sein de la couche. Ceci expliquerait le profil de densité électronique décroissant lentement vers la densité électronique de l'eau.

Les fragments C-EC1-5His semblent former des dimères *trans* au sein des monocouches que nous élaborons en présence de solution riche en calcium. Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons nous intéresser dans la section suivante aux effets d'un chélatant d'ions divalents sur des monocouches de fragments C-EC1-5His. L'influence d'un chélatant d'ions sur les complexes de fragments dépendants du calcium devrait être plus grande que la simple dilution du calcium.

IV.2.3.2 Effet de l'addition d'un chélatant d'ions divalents

Puisque les interactions entre les domaines extracellulaires des cadhérines sont dépendantes de la présence d'ions calcium, des additions successives d'un chélatant d'ions divalents puis de calcium devraient se comporter comme un "interrupteur" engendrant la dissociation ou l'association des cadhérines. De cette manière, si les fragments de C-cadhérine sont ancrés sous forme de complexes *trans*, des phénomènes de désorption et d'adsorption devraient se succéder. Cette section présente d'abord des mesures ellipsométriques mettant en évidence la présence de complexes *trans* au sein de la monocouche, puis nous présentons des expériences de réflectivité X permettant d'étudier les interactions entre fragments de C-cadhérine.

Adsorption et désorption suivies par ellipsométrie

Nous avons effectué des expériences d'ellipsométrie sur des monocouches de fragments C-EC1-5His incubés dans une solution contenant initialement une concentration élevée en calcium (5 mM CaCl_2). Sur toutes les courbes présentées, le temps est compté à partir de l'injection des fragments de cadhérine en début d'expérience, l'injection n'apparaissant pas sur les figures.

a) Expérience A : Décrochage de fragments

Une première expérience A étudie le comportement de la monocouche de fragments C-EC1-5His lorsque la sous-phase est appauvrie en calcium par la chélation des ions divalents par l'EGTA, présentée sur la Figure 72. La densité de masse adsorbée apparente calculée à partir des angles ellipsométriques est de $7,8 \text{ mg/m}^2$ pour la monocouche initiale de fragments C-EC1-5His (Tableau 12). Des ajouts successifs d'EGTA à des concentrations finale de $75 \text{ }\mu\text{M}$, $150 \text{ }\mu\text{M}$ puis 75 mM entraînent une chute des angles ellipsométriques correspondant à une diminution de la densité massique de surface. Après les deux premiers ajouts d'EGTA conduisant à une concentration finale en EGTA de $150 \text{ }\mu\text{M}$, la masse adsorbée apparente chute à $5,4 \text{ mg/m}^2$, ce qui correspond à une diminution de 30% de la masse apparente adsorbée. L'addition d'EGTA pour atteindre une concentration finale de 75 mM entraîne une chute de la masse adsorbée plus importante représentant 62% de la masse initiale, et la masse adsorbée apparente est de 3 mg/m^2 .

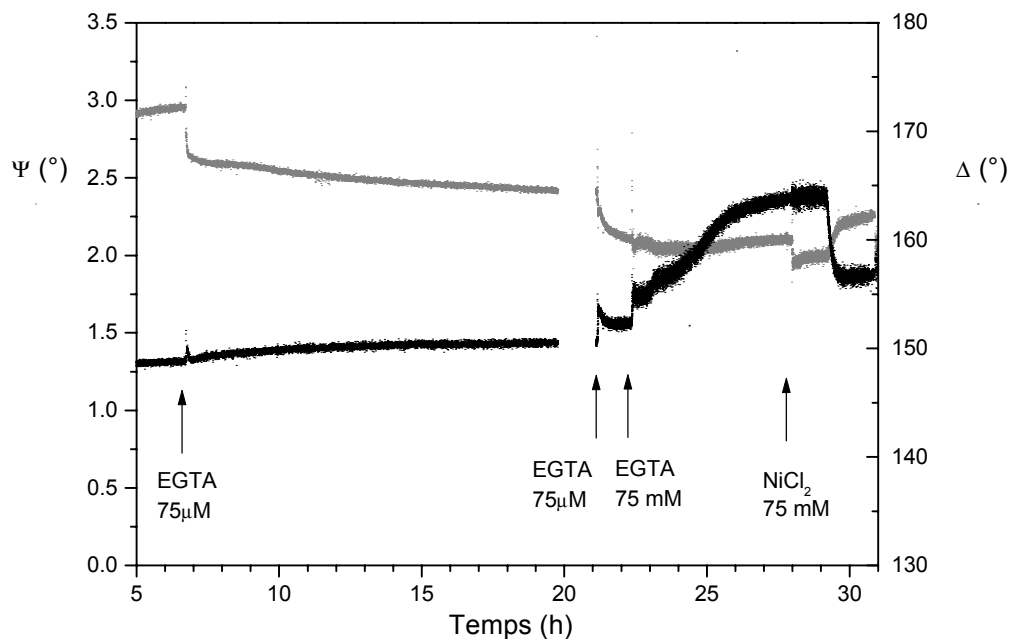


Figure 72 : Expérience A : variations des angles ellipsométriques ψ et Δ après injections d'EGTA (courbes noire = Δ , grise = ψ). Conditions Expérimentales initiales: $[\text{Ca}^{2+}] = 5 \text{ mM}$, $[\text{C-EC1-5His}] = 1,5 \text{ } \mu\text{M}$, lipides Ni-NTA-DLGE:DTPC (1:1).

L'EGTA est susceptible de chélater tous les ions divalents, donc les ions Ni^{2+} et les ions Ca^{2+} (voir II.2.3). La diminution de la masse adsorbée apparente observée peut être attribuée à la fois à une dissociation de complexes *trans* de fragments et à un décrochement des fragments C-EC1-5His des lipides. Pour distinguer ces deux possibilités, nous avons injecté en sous-phase une solution de NiCl_2 pour atteindre une concentration en solution de 75 mM d'ions Ni^{2+} . L'addition d'ions Ni^{2+} dans la sous-phase provoque une variation des angles ellipsométriques correspondant à une adsorption de fragments de cadhérine aux lipides. La densité massique de surface est de 4,5 mg/m² après l'addition des ions Ni^{2+} , ce qui correspond à 58% de la masse adsorbée apparente de la monocouche initiale. La forte concentration en EGTA (75mM) a donc déséquilibré l'interaction histidine-nickel. Cependant, l'addition d'ions Ni^{2+} ne permet pas de recouvrer la totalité de la masse perdue par l'ajout de l'EGTA. La quantité de fragments de C-cadhérine décrochés de la surface semble provenir à la fois de la dissociation des complexes lipides-cadhérines et d'une dissociation de dimères antiparallèles de fragments de C-cadhérine. Pour distinguer entre ces deux contributions, nous avons effectué une expérience similaire en ajoutant des ions calcium après l'addition d'EGTA.

b) Expérience B : adsorption dépendante du calcium

Dans l'expérience A, le rapport molaire des concentrations en EGTA et en Ca^{2+} était de 15. Dans une deuxième expérience (B), nous avons réduit la concentration en EGTA à un rapport de 2, soit une concentration finale de 10 mM en EGTA. Cette concentration plus faible en agent chélatant devrait limiter le détachement des fragments des lipides. Le suivi ellipsométrique de cette expérience est présenté sur la Figure 73. Comme dans l'expérience A, la densité massique de

surface diminue après l'addition d'EGTA : elle passe de 7,0 mg/m² pour la monocouche initiale à 5,8 mg/m², ce qui correspond à une diminution de 17% de la masse adsorbée apparente (voir le Tableau 14).

Pour limiter les effets de l'EGTA sur les interactions lipides-protéine, nous avons injecté rapidement des ions calcium, c'est-à-dire 1/2 heure après la stabilisation des angles ellipsométriques. La concentration finale en ions calcium est égale à celle en EGTA, c'est-à-dire de 10 mM. L'évolution des angles ψ et Δ indique que la désorption des cadhérines est réversible par ajout de calcium. La densité massique de surface est de 6,7 mg/m² après l'addition de calcium, soit 95% de la densité initiale.

Pour tester cette hypothèse, il est nécessaire d'ajouter des ions Ni²⁺ en solution après l'addition de calcium.

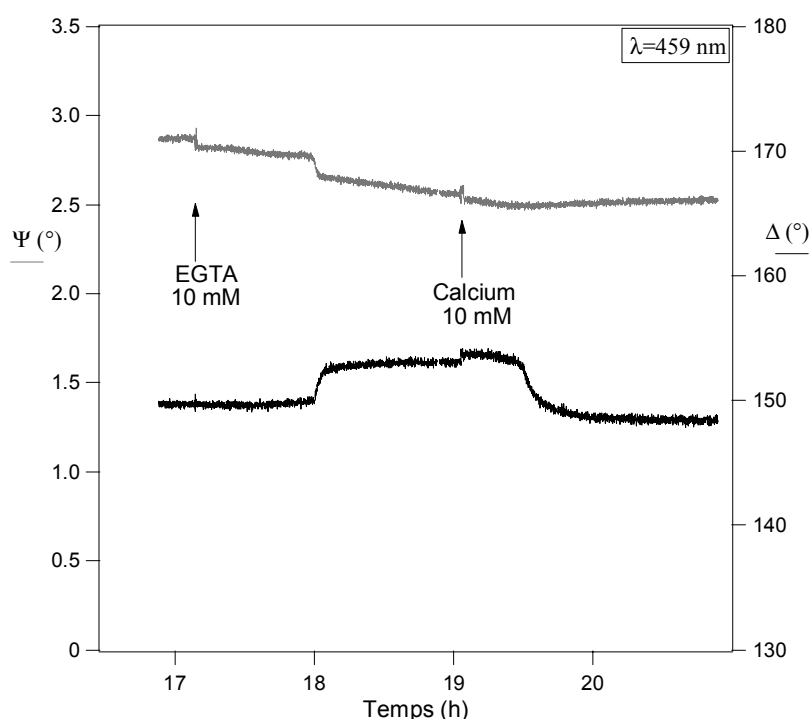


Figure 73 : Expérience *B* : variations des angles ellipsométriques ψ et Δ après une injection d'EGTA, puis de calcium. (Courbes noire = Δ , grise = ψ). Conditions Expérimentales initiales: $[Ca^{2+}] = 5$ mM, $[C\text{-}EC1\text{-}5His] = 0,75$ μ M, lipides Ni-NTA-DLGE:DTPC (1:3).

c) Expérience *C*: Influence de l'ajout de nickel après celui du calcium

Les effets successifs de l'ajout d'EGTA, d'ions calcium puis d'ions nickel sont observés à l'aide d'un protocole similaire à celui de l'expérience *B*. La densité massique de surface apparente est de 6,1 mg/m² pour la monocouche initiale, et de 4,6 mg/m² après l'ajout d'EGTA à une concentration finale de 10 mM, soit une perte de 25% de la masse initiale (voir le Tableau 14). La Figure 74 présente le suivi ellipsométrique de cette expérience. Après l'addition de calcium à une concentration finale de 10 mM, un niveau semblable à la densité massique de surface de la monocouche initiale est atteint : la masse adsorbée apparente est de 5,5 mg/m², ce qui représente 90% de la masse initiale. Un ajout de nickel à une concentration finale de 25 μ M puis 10 mM conduit à une faible variation des

angles ellipsométriques, correspondant à une masse adsorbée apparente de 5,3 mg/m², et 87% de la masse initiale.

Ainsi, après la désorption consécutive à l'ajout de l'EGTA, une adsorption est engendrée par l'addition de calcium. L'addition des ions Ni²⁺ n'a donc pas modifié la densité de la monocouche.

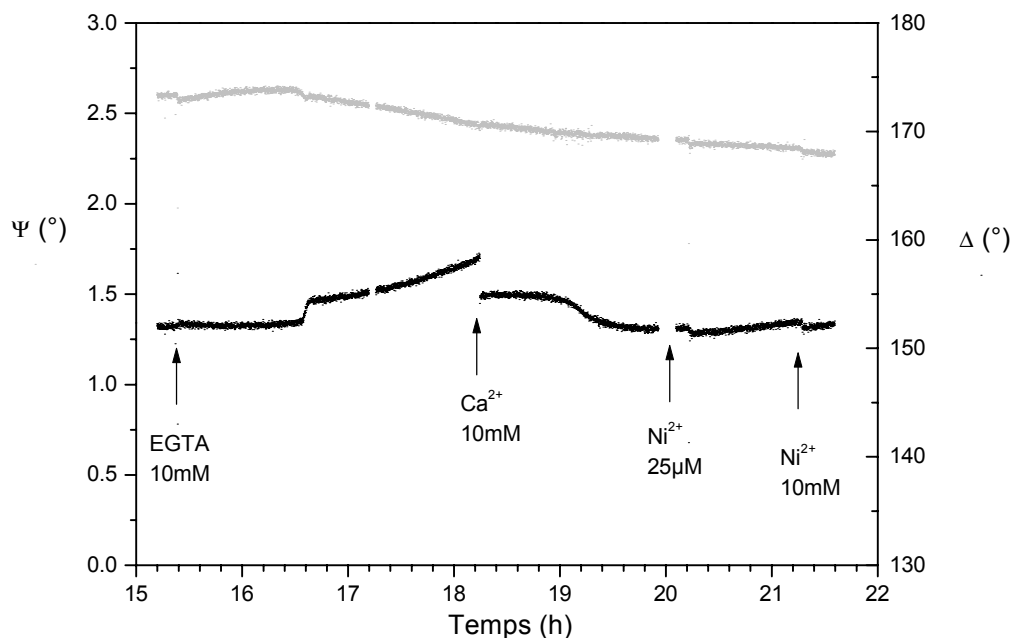


Figure 74 : Expérience C : variations des angles ellipsométriques ψ et Δ après une injection d'EGTA, puis de calcium et de nickel. (Courbes noire = Δ , grise = ψ). Conditions Expérimentales initiales: $[\text{Ca}^{2+}] = 5 \text{ mM}$, $[\text{C-EC1-5His}] = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$, lipides Ni-NTA-DLGE:DTPC (1:1).

Discussion et hypothèses d'interprétation

Nous avons suivi l'évolution de la masse adsorbée apparente de fragments C-EC1-5His à une monocouche de lipides lors de l'ajout de l'agent chélatant d'ions divalents EGTA et des ions Ni²⁺ et Ca²⁺. L'objectif était de vérifier la présence de dimères *trans* de fragments C-EC1-5His de C-cadhérines. Le Tableau 14 rassemble les résultats obtenus par les trois expériences présentés dans cette section.

Les différences de densité massique de surface observées d'une monocouche à l'autre proviennent des concentrations initiales en protéines différentes, comme indiqué sur le Tableau 14. La masse est de 7,8 mg/m² lorsque la concentration initiale en protéine est de 1,5 μM . Elle diminue de 10% lorsque la quantité de fragments de cadhérine injectés est diminué de moitié. Pour une concentration finale en cadhérine de 0,5 μM , soit un tiers, la densité massique de surface diminue de 20%. Si l'on considère les durées d'incubation, on peut conclure que la concentration en cadhérines dans la sous-phase influence essentiellement la cinétique d'adsorption qui est plus lente pour des solutions plus diluées. Le retard observé de l'effet de l'EGTA est attribué au temps nécessaire à l'homogénéisation de la solution en sous-phase, car pour cette expérience nous n'avions pas utilisé de circulation avec une pompe péristaltique.

Expérience A			Expérience B			Expérience C		
Etapes	Masse (mg/m ²)	%	Etapes	Masse (mg/m ²)	%	Etapes	Masse (mg/m ²)	%
[CaCl ₂]=5mM	7,8		[CaCl ₂]=5mM	7,0		[CaCl ₂]=5mM	6,1	
[EGTA]=75μM	5,4	-30%	[EGTA]=10mM	5,8	-17%	[EGTA]=10mM	4,6	-25%
[EGTA]=75mM	3,0	-62%	[CaCl ₂]=10mM	6,7	-5%	[CaCl ₂]=10mM	5,5	-10%
[NiCl ₂]=75mM	4,5	-32%				[NiCl ₂]=10mM	5,3	-13%
[C-EC1-5His]	1,5 μM		0,75 μM			0,5 μM		

Tableau 14 : Comparaison des densités massiques surfaciques apparentes de monocouches de fragments C-EC1-5His en fonction de la concentration en sous-phase en chélatant d'ions EGTA, ions Ni²⁺ et ions Ca²⁺. La concentration en C-EC1-5His indiquée est la concentration de la sous-phase après injection des cadhérines.

Les monocouches initiales sont *a priori* formées de complexes *trans* et *cis* de fragments C-EC1-5His. Après l'adjonction de l'agent EGTA, la concentration en calcium de la sous-phase est réduite. Nous avons observé alors une chute de la densité de fragments en surface, reportée dans le Tableau 14. L'observation dans l'expérience A de l'influence des ions nickel après l'injection d'EGTA à forte concentration (75 mM) indique que l'équilibre n'est pas atteint dans les expériences B et C. Elle suggère que la concentration en agent chélatant est trop importante dans l'expérience A. En effet, lorsque la concentration en EGTA est fortement diminué et égale seulement au double de la concentration initiale en ions calcium (10 mM, expérience C), l'ajout d'ions nickel n'est plus suivie d'effet. Ainsi, une concentration moindre en EGTA et un temps d'incubation plus court après l'addition d'EGTA semblent permettre de réduire les possibilités d'interaction entre l'EGTA et l'ion nickel des lipides. En revanche, la simple addition d'ions calcium induit dans tous les cas une remontée de la masse adsorbée apparente qui permet de retrouver une quantité de masse adsorbée proche de sa valeur initiale (expériences B et C). Cela implique que l'apport en ions calcium permet de contre-balancer un effet de l'EGTA.

Ainsi, à partir des trois expériences présentées, nous pouvons proposer une hypothèse sur l'état oligomérique des fragments de C-EC1-5His au sein de la monocouche. Une partie des complexes de fragments est susceptible de se dissocier lorsque la concentration en calcium diminue. En conséquence, ce sont des monomères de fragments qui restent ancrés aux lipides. La présence d'ions Ca²⁺ pourrait alors permettre aux fragments relargués en solution d'interagir à nouveau en formant des complexes (*cis* ou *trans*) avec les fragments restés à la sur-

face. D'un autre côté, la présence d'ions Ni^{2+} pourrait permettre à une partie des fragments présents en solution de se lier de nouveau aux lipides.

Il se peut que des fragments ayant été impliqués dans des complexes *trans* puis s'étant dissociés lors de l'appauvrissement en calcium de la solution par l'EGTA, se lient directement aux lipides par retournement de 180° . Cela pourrait apporter une justification à l'observation de moins de 50% de la masse de fragments qui se dissocient (expérience *B* et *C*). Cependant, le taux de rattachement de fragments aux lipides est *a priori* le même pour toutes les mesures et ne peut pas correspondre spécifiquement à une réaction à l'addition d'ions Ca^{2+} . Par ailleurs, il est possible que les fragments de cadhérine soient plus flexibles lorsque la concentration en calcium de la solution est faible. En effet, les sites de fixation du calcium situés à la jonction entre domaines, jouent un rôle dans l'intégrité de la structure des fragments de cadhérine [Pertz 1998]. Ainsi, les lipides pourraient être moins accessibles aux fragments, ce qui expliquerait que la densité massique de surface ne retrouve pas son niveau initial.

La Figure 75 présente une explication schématisée de l'expérience *A*. (a) La monocouche de fragments à l'état initial présente des dimères *trans*. (b) Après additions successives d'EGTA, une perte de masse est observée, liée à la fois une dissociation de complexes *trans* de fragments et à un décrochage des fragments des lipides. (c) Après ajout d'ions nickel, une prise de masse est observée, liée à l'ancrage des fragments aux lipides.

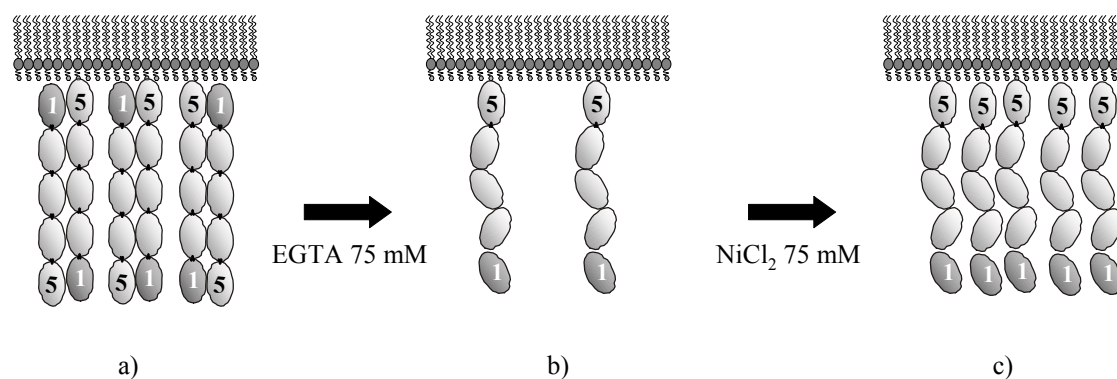


Figure 75 : Représentation de l'expérience présentée sur la Figure 72. Après addition d'une forte concentration d'EGTA (75 mM, excès $\times 15$ par rapport aux ions Ca^{2+}), les fragments de C-cadhérine se dissocient en monomères et certains se détachent des lipides. Après l'ajout d'ions nickel à une concentration égale à celle de l'EGTA (75 mM), des fragments interagissent de nouveau avec les lipides, mais les interactions *cis* ou *trans* entre fragments de C-cadhérine ne sont pas permises à cause du manque de calcium.

La Figure 76 propose une hypothèse d'interprétation des expériences *B* et *C*. (a) A partir d'une monocouche de référence, la perte de masse observée après l'adjonction d'EGTA peut être interprétée à une dissociation de complexes *trans* de fragments C-EC1-5His (b). (c) La simple addition d'ions Ca^{2+} pourrait refléter une ré-association des fragments entre eux à la surface lipidique. (d) Dans l'expérience *C*, l'ajout d'ions Ni^{2+} ne modifie pas notablement la situation, suggérant qu'à cette concentration, l'agent chélatant EGTA ait peu déstabilisé les liaisons histidine-nickel responsables des interactions entre lipides et protéines.

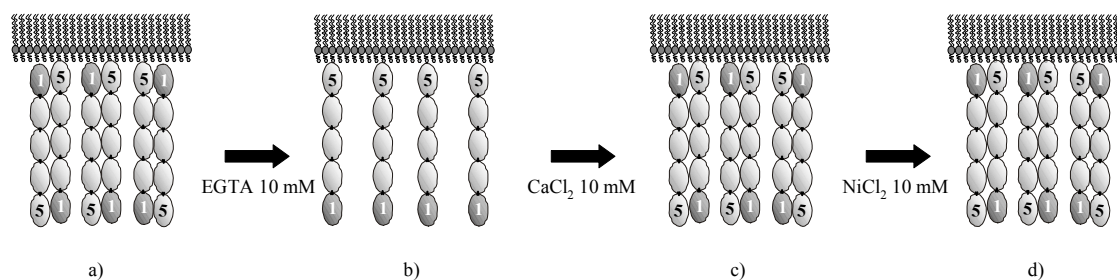


Figure 76 : Représentation des expériences *B* et *C* (présentée sur la Figure 73 et la Figure 74). Après addition d'une concentration en EGTA de 10 mM, les fragments C-EC1-5His se dissocient en monomères mais restent ancrés aux lipides. Après l'ajout d'ions calcium à une concentration de 10 mM, les fragments interagissent en formant des interactions *trans*. Un ajout de nickel ne change pas la situation (expérience *C* uniquement).

Réflectivité des rayons X

Sur la base des expériences d'ellipsométrie que nous venons de présenter, nous avons réalisé une série de mesures de réflectivité X sur une monocouche de fragments C-EC1-5His avant et après l'ajout d'EGTA afin de comparer les structures des monocouches. Afin de ne pas entraîner le détachement des cadhérines des lipides, nous avons employé le protocole suivant :

1. Addition d'EGTA à une concentration finale de 5 mM final,
2. Addition d'une solution de NiCl_2 à une concentration de 1 mM,
3. Addition d'une solution de CaCl_2 à une concentration de 5 mM,
4. Addition de fragments C-EC1-5His de manière à atteindre une concentration totale de $0,74 \mu\text{M}$.

Les additions successives sont suivies d'homogénéisations de 30 minutes via la pompe péristaltique. Le choix de ce protocole est dicté par le fait qu'une trop longue incubation des fragments de C-cadhérine dans une solution contenant de l'EGTA peut entraîner le décrochement des fragments des lipides par la chélation des ions Ni^{2+} par l'EGTA. L'homogénéisation par la pompe péristaltique perturbant beaucoup la surface de l'eau, une mesure de réflectivité X durant entre 1 et 1,5 heures, il n'a donc pas été possible de faire de mesures intermédiaires entre les additions successives. Seul l'état final a été mesuré, les états intermédiaires ayant été observés par ellipsométrie.

La Figure 77 présente la courbe de réflectivité X et un ajustement correspondant, mesurée sur une monocouche de fragments C-EC1-5His incubée pendant 3,5 heures dans une solution contenant 5 mM CaCl_2 . La Figure 78 montre la courbe de réflectivité mesurée après le traitement décrit ci-dessus, ainsi qu'un ajustement calculé. La Figure 79 présente les profils de densité électronique calculés à partir de ces ajustements.

Les profils de densité électronique avant et après le traitement par l'agent chélatant EGTA sont très semblables. Par conséquent, ce traitement a très peu perturbé la structure de la monocouche de fragments C-EC1-5His.

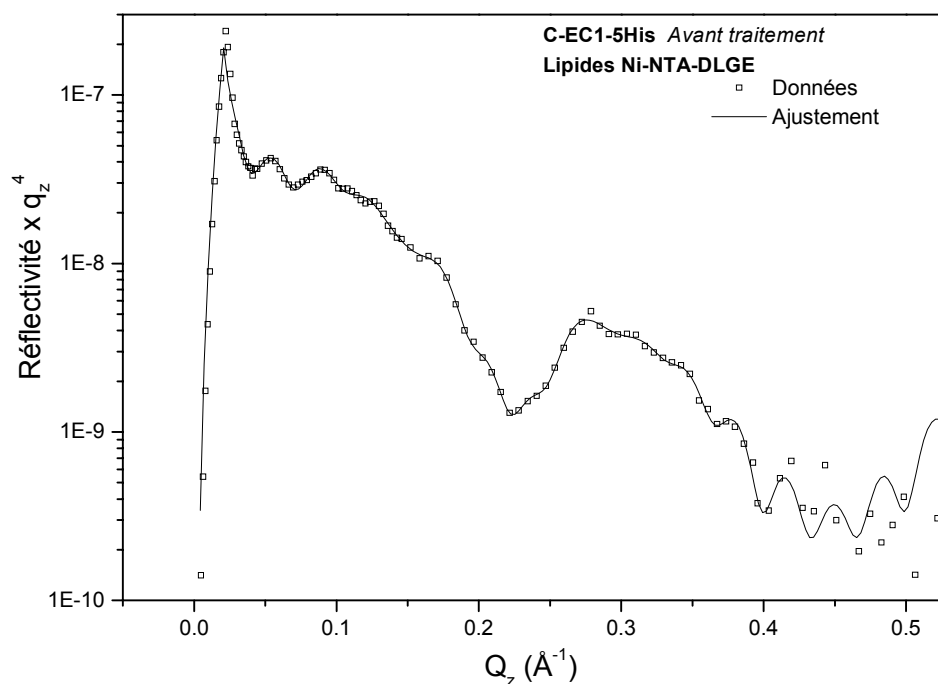


Figure 77 Courbe de réflectivité X et ajustement pour la monocouche "avant traitement", c'est-à-dire la monocouche de fragments C-EC1-5His incubée sur une sous-phase à 5 mM CaCl_2 pendant 3h30. Conditions Expérimentales : lipides Ni-NTA-DLGE.

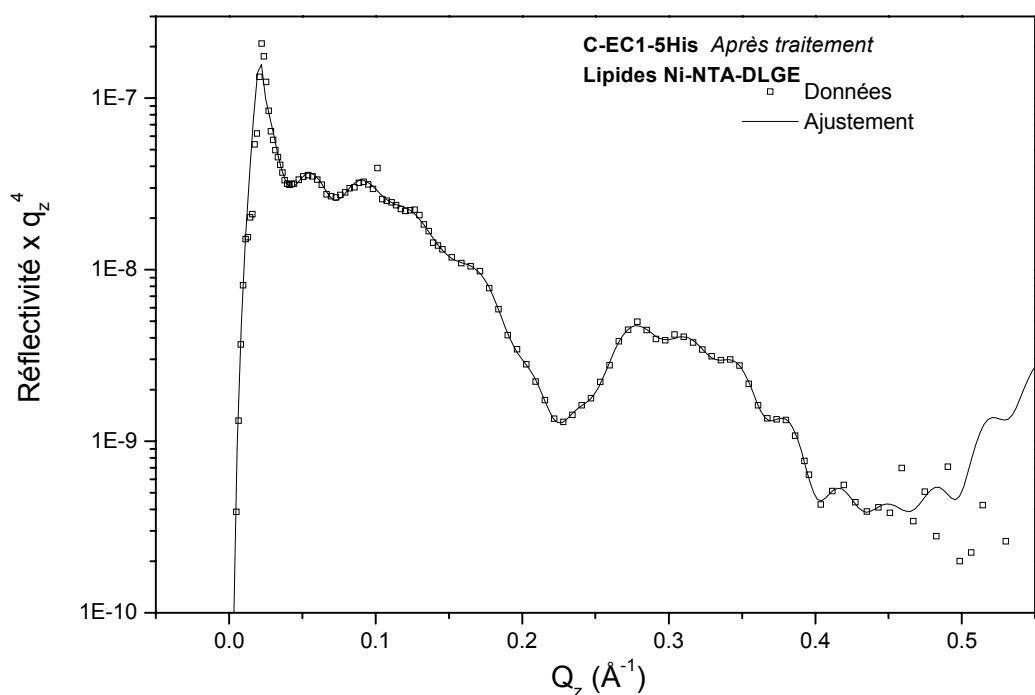


Figure 78 : Courbe de réflectivité X et ajustement pour la monocouche "après traitement" c'est-à-dire la monocouche de fragment C-EC1-5His après additions successives d'EGTA (5 mM), puis de NiCl_2 (1 mM), puis de CaCl_2 (5 mM) et enfin de C-EC1-5His (total 0,74 μM). Conditions Expérimentales : lipides Ni-NTA-DLGE

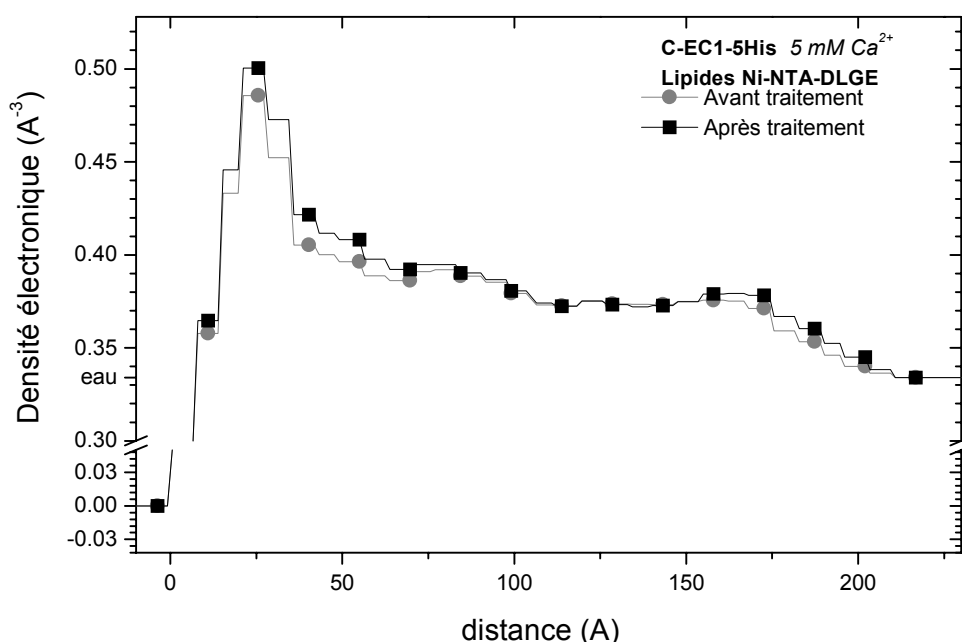


Figure 79 : Profils de densité électronique correspondant aux ajustements. Le profil de densité électronique "avant traitement" se réfère à la mesure faite sur la monocouche de fragments C-EC1-5His incubée sur une sous-phase à 5 mM CaCl_2 . Le profil de densité électronique "après traitement" se réfère à cette même monocouche après addition d'EGTA (5 mM), puis de NiCl_2 (1 mM), puis de CaCl_2 (5 mM) et enfin de C-EC1-5His (total 0,74 μM).

Discussion : effets de l'EGTA sur les fragments de C-cadhérine

Puisque l'EGTA chélate en solution à la fois les ions Ni^{2+} et les ions Ca^{2+} , il est *a priori* possible qu'une partie des dimères anti-parallèles se dissocie en monomères ou dimères parallèles et une autre partie des protéines se détache des lipides. Trois hypothèses peuvent être avancées pour interpréter ces résultats de réflectivité X :

(1) des complexes de fragments de C-cadhérine se seraient dissociés suite à l'appauvrissement de la sous-phase en calcium dû à l'action de l'EGTA. Grâce à l'apport d'ions Ca^{2+} et de fragments de C-cadhérine, des complexes *trans* se reforment dans la monocouche. Cette hypothèse est représentée sur la Figure 76 (a-c).

(2) des complexes de fragments pourraient se dissocier des lipides par l'action de l'EGTA, puis se lier de nouveau aux lipides après l'apport en ions Ni^{2+} , comme le représente la Figure 75.

(3) il est possible que très peu de fragments réagissent à la présence de l'EGTA parce que les ions Ni^{2+} ou Ca^{2+} ne sont pas accessibles à l'agent chélatant du fait de la compacité de la couche. Dans ce cas, les protéines pourraient rester ancrées à la monocouche lipidique dans leur état mono- ou dimérique.

Les mesures d'ellipsométrie présentées au début de cette section sont compatibles avec la première hypothèse et semblent rejeter les hypothèses 2 et 3. L'effet de l'EGTA est visible 30 minutes après son injection sur la courbe ellipsométrique présentée sur la Figure 73. Par ailleurs, S. Sivasankar *et al.* ont utilisé un

protocole similaire pour réaliser les mesures de forces de surface entre fragments C-EC1-5His de C-cadhérine [Sivasankar2001b]. Les auteurs ont laissé incubé les fragments de C-cadhérine pendant 30 minutes dans une solution de concentration en EGTA 28 mM. Puis, les fragments de C-cadhérine ont été injectés sur une surface de mica recouverte d'une bicouche de lipides dont la monocouche supérieure contient des lipides chélatant un ion nickel. Après l'adsorption des fragments de C-cadhérine aux lipides fonctionnalisés, les auteurs ont ajouté en solution la quantité d'ions calcium nécessaire pour atteindre une concentration de 2mM. Par cette méthode, les auteurs obtiennent des monocouches de fragments de C-cadhérine capables d'interagir pour former des complexes *trans*. L'utilisation d'un protocole identique nous permet de supposer que l'agent EGTA a eu un effet sur les fragments, en faveur de l'hypothèse 1. Il n'est néanmoins pas possible d'exclure qu'une partie des fragments C-EC1-5His se soient détachés de complexes antiparallèles puis ancrés immédiatement à un lipide par une interaction entre ion nickel et histidine.

IV.2.3.3 Conclusion sur la présence de complexes de fragments C-EC1-5His

Nous avons observé que la chute de masse adsorbée par simple dilution du calcium est plus faible que par ajout d'un chélatant d'ions. Il est possible que les sites de fixation du calcium soit "protégés" au sein de la monocouche. Les constantes de dissociation mesurées par O. Pertz *et al.* [Pertz1999] concernent les affinités entre domaines extracellulaires en solution. Or, la densité de cadhérine que nous observons au sein de la monocouche semble indiquer que celle-ci est très compacte et par conséquent que les fragments de C-cadhérine sont proches les uns des autres. Cet arrangement pourrait autoriser des interactions entre les domaines extracellulaires non observées en solution pour des concentrations faibles en calcium. En revanche, il n'est pas possible de différencier entre dimères parallèles et monomères en ce qui concerne les cadhérines restant ancrées aux lipides.

IV.2.4 Interactions entre fragments extracellulaires de C-cadhérine

Pour étudier les associations entre fragments de C-cadhérine, il peut être intéressant de constituer d'abord une monocouche de fragments C-EC1-5His sous forme de monomères, pour tenter de lier soit des fragments identiques, soit des fragments plus courts. L'évolution de la monocouche après un ajout dans la sous-phase de calcium et de nouveaux fragments de cadhérine, devrait permettre de mettre en évidence, si elle a lieu, la formation de complexes adhérents entre les fragments de cadhérine. Dans le cas où les fragments de cadhérine ajoutés seraient des fragments extracellulaires entiers, une telle expérience pourrait apporter des informations sur la formation des complexes anti-parallèles de fragments à la surface lipidique. En utilisant des fragments courts de cadhérine, les interactions entre les différents domaines pourraient être localisées le long de la protéine, ce qui reste actuellement une question ouverte fondamentale dans l'étude des cadhérines.

IV.2.4.1 Interactions entre fragments extracellulaires identiques de C-cadhérine

Protocole de l'expérience

L'étape initiale de notre étude est la formation d'une monocouche de fragments C-EC1-5His élaborée en présence d'une solution à faible concentration en calcium, inférieure à 0,5 mM. A cette concentration, les fragments de cadhérine sont sous forme de monomères et ne sont pas capables de former des complexes *cis* ou *trans* [Pertz 1998]. Ensuite, pour étudier la formation de complexe, la solution constituant la sous-phase doit être échangée avec une solution riche en calcium, de concentration supérieure à 1 mM [Pertz 1998]. Deux méthodes différentes sont à notre disposition pour former la monocouche de départ (1) des fragments C-EC1-5His sont injectés dans une solution tampon pauvre en calcium à partir de solutions concentrées en fragment; (2) des fragments sont incubés dans une solution tampon pauvre en calcium préalablement à leur injection.

Nous avons déjà présenté la première méthode dans les expériences de ce chapitre. Cette méthode présente l'avantage d'utiliser la protéine dans les mêmes conditions initiales que dans l'étude précédente et d'en faciliter les comparaisons. Un inconvénient, que nous avons mentionné précédemment, est qu'une partie des fragments de cadhérine pourrait se lier à la monocouche lipidique sous la forme de dimères et ne serait pas capable d'interagir avec les fragments de cadhérine injectés dans un deuxième temps en solution. L'équipe de D. Gulino a en effet montré que la dissociation de fragments de VE-cadhérine en monomères par dilution de la protéine peut être très longue : 24 heures à température ambiante [Legrand 2001]. Par une adjonction de l'agent chélatant EGTA ou EDTA ou par une dilution de la solution tampon, ce temps peut être largement raccourci. Néanmoins par cette technique, il est délicat d'obtenir une monocouche formée uniquement de monomères de cadhérine.

La deuxième méthode consiste en l'injection d'une solution de cadhérines préalablement incubée 12h à 24h avec une faible concentration en ions Ca^{2+} . Les fragments de cadhérine sont alors sous forme monomérique au moment de l'injection. Un inconvénient est que les fragments de cadhérine sont plus sensibles aux protéases lorsque le milieu est pauvre en calcium. Une concentration minimale de 0,050 mM a été déterminée par O. Pertz *et al.* pour éviter une dénaturation des fragments extracellulaires de cadhérine [Pertz 1998]. P. Legrand *et al.* ont montré qu'un minimum de 0,5 mM de calcium est nécessaire à la conservation à long terme des fragments de VE-cadhérine en solution [Legrand 2001]. Nous avons choisi cette deuxième méthode pour obtenir une monocouche formée d'une majorité de monomères de fragments C-EC1-5His.

Des fragments C-EC1-5His ont préalablement à la formation de la monocouche incubés pendant 16h30 à 8°C dans une solution contenant 0,2 mM de calcium. La formation d'une monocouche en présence d'une solution contenant 0,1 mM de calcium a été observée par ellipsométrie (étape A). Après saturation de la monocouche déterminée par la stabilisation des angles ellipsométriques, la solution constituant la sous-phase a été totalement changée par une solution tampon

identique mais ne contenant pas de protéine et une concentration en calcium de 5,5 mM (étape *B*). Puis, des fragments C-EC1-5His préparés de la même façon (c'est-à-dire que la forme monomérique est largement majoritaire) ont été injectés à une concentration finale en fragments de 0,5 μM (étape *C*). Le Tableau 15 rassemble les masses adsorbées apparentes évaluées par l'analyse des courbes ellipsométriques angulaires effectuées au long de cette expérience.

Résultats

La Figure 80 présente l'évolution de la masse adsorbée apparente calculée à partir de mesures ellipsométriques angulaires de la monocouche de fragments C-EC1-5His en fonction du temps. La masse adsorbée apparente était alors de 5,8 mg/m^2 . Lorsque la sous-phase initiale a été changée par une solution tampon contenant une forte concentration en calcium (étape *B*), la masse adsorbée apparente n'a pas varié, à 5,8 mg/m^2 . Puis, l'addition de fragments C-EC1-5His majoritairement monomériques (étape *C*) a conduit à une masse apparente adsorbée de 7,2 mg/m^2 , correspondant à une augmentation de masse de 24% par rapport à la valeur initiale.

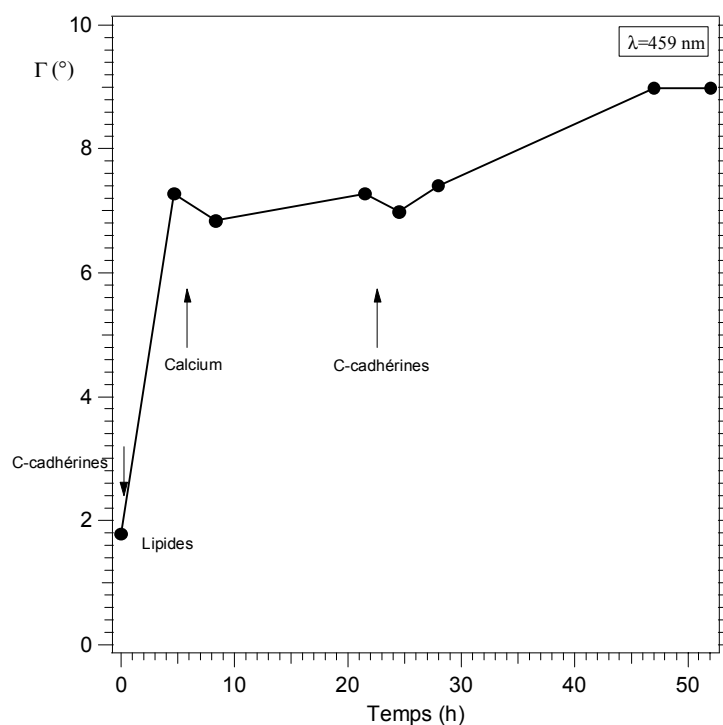


Figure 80 : Densité massique de surface apparente mesurée par ellipsométrie en fonction du temps. Conditions Expérimentales initiales : [C-EC1-5His] = 0,5 μM , $[\text{Ca}^{2+}]$ = 0,1 mM, lipides Ni-NTA-DLGE. Les fragments C-EC1-5His constituant la monocouche initiale sont injectés au temps $t=0$.

Après l'étape *B*, la sous-phase ne contient pas de fragments C-EC1-5His pouvant interagir avec les lipides ou les fragments constituant la monocouche. En conséquence, la masse adsorbée apparente est stable. A l'étape *C*, des fragments C-EC1-5His sous forme monomérique ont été injectés et sont susceptibles de se former des complexes avec d'autres fragments au sein de la monocouche ou de se lier à des lipides. La forte augmentation de masse adsorbée apparente (+ 24%)

indique qu'une partie des fragments C-EC1-5His ayant été injectés dans un deuxième temps se sont ancrés à la surface de la couche lipide+protéine.

Etapes	Masse (mg/m ²)	%
[Ca ²⁺]=0,1 mM	5,8	
[Ca ²⁺]=5,5 mM	5,8	0%
[C-EC1-5His]=0,5μM	7,2	+ 24%

Tableau 15 : Masses adsorbées apparentes et pourcentages d'augmentation de la masse calculés par rapport à la masse adsorbée apparente initiale, correspondant à la Figure 80.

Discussion : un auto-assemblage de fragments C-EC1-5His ?

Les résultats présentés montrent que des fragments monomériques injectés dans l'étape C se sont liés à la monocouche initiale. Cela peut être dû à deux possibilités : soit une association de fragments monomériques en complexes *trans*, soit une interaction lipide-protéine par une liaison histidine-nickel.

En effet, les fragments de cadhérine injectés sont identiques à ceux ayant formé la monocouche initiale, c'est-à-dire qu'ils possèdent une étiquette polyhistidine. L'augmentation de masse consécutive à l'addition des cadhérines pourrait être en partie due à un ancrage de fragments à la monocouche lipidique. Il serait nécessaire de reproduire cette expérience avec des fragments de cadhérine ne possédant pas d'étiquette polyhistidine afin de s'assurer que l'adsorption aux lipides ligands des fragments de cadhérine injectés dans un deuxième temps est faible par rapport aux interactions entre fragments de cadhérine. Une telle construction est actuellement disponible au sein de l'équipe de D. Gulino à l'I.B.S. (*communication personnelle*).

Dans le cadre de l'hypothèse de l'auto-assemblage de cadhérine, l'augmentation de masse pourrait être au maximum de 50 % si la totalité des fragments C-EC1-5His de la monocouche initiale était sous forme monomérique et si les fragments injectés dans un deuxième temps interagissaient en formant uniquement des dimères anti-parallèles en surface. Elle pourrait être plus élevée si certains fragments injectés dans l'étape C se lient aux lipides. Or, la masse apparente n'a augmenté que de 24% après la deuxième injection des fragments de cadhérine. La prise de masse est donc faible par rapport à l'augmentation attendue. Nous avons précédemment signalé que l'évaluation de la masse adsorbée apparente est délicate et peut être faussée par la présence de la monocouche de lipides. En effet, la contribution des lipides à la masse adsorbée apparente estimée par ellipsométrie ne peut pas être soustraite de la masse totale. Ceci implique que l'augmentation de la masse de protéine adsorbée après la deuxième injection de fragments est sous-estimée.

Par ailleurs, il se pourrait que des dimères *trans* étaient déjà présents en surface dans l'étape initiale (étape A). Cela pourrait réduire le nombre de fragments pouvant se lier à la monocouche préexistante. La présence de complexes *trans*

dans l'état initial peut être dû à plusieurs raisons. Tout d'abord, il est possible que des fragments de cadhérine interagissent lorsqu'ils sont ancrés à la monocouche lipidique, alors qu'ils n'interagissent pas en solution. L'équilibre monomère-dimère pourrait être déplacé par l'immobilisation des fragments. En effet, la concentration de fragments en surface est très grande lorsque les fragments sont rassemblés en monocouche. Par ailleurs, l'incubation des cadhérines dans la solution pauvre en calcium pourrait avoir été trop courte pour que la totalité des dimères en solution initiale se dissocient.

Néanmoins, il n'est pas possible, au vu de ces résultats, de trancher entre une interaction lipide-protéine ou inter-protéine. Les expériences présentées précédemment dans ce chapitre ont mis en évidence la dissociation de complexes de fragments C-EC1-5His par l'appauvrissement en calcium de la solution constituant la sous-phase. Ainsi, des interactions entre fragments liés aux lipides et formant une monocouche existent. La formation de complexe de fragments C-EC1-5His ne peut pas donc pas être exclue. L'augmentation de masse adsorbée apparente est donc plus vraisemblablement due aux deux processus.

IV.2.4.2 Interactions entre fragments C-EC1-5His et fragments contenant un domaine Fc

L'intérêt des fragments produits par l'équipe de B. Gumbiner [Chappuis-Flament 2001] est de forcer la dimérisation des fragments de C-cadhérine grâce à la formation d'un pont disulfure entre deux domaines Fc d'immunoglobulines liés à deux fragments de cadhérine. D'après les auteurs, les parties extracellulaires de cadhérine interagissent de manière antiparallèle par l'intermédiaire de dimères parallèles à la surface des cellules. Les fragments courts pourraient ne pas être capables de former des dimères parallèles à cause de l'absence de certains domaines. La dimérisation parallèle forcée de ces fragments pourrait aider à la formation de complexes antiparallèles.

Protocole de l'expérience

Nous avons élaboré une monocouche de fragments C-EC1-5His en présence d'une solution contenant une concentration en calcium de 0,5 mM. Puis, la concentration en calcium a été augmentée à 2,5 mM et des fragments Fc-C-EC1-3 ont été injectés à une concentration finale de 0,29 μ M six heures après l'injection des fragments C-EC1-5His. La monocouche ainsi formée a été mesurée plusieurs fois par réflectivité X pendant 24h. Une courbe de réflectivité X caractéristique ainsi qu'un ajustement sont présentés sur la Figure 81.

Résultats

Le profil de densité électronique déterminé à partir de l'ajustement présenté sur la Figure 82 indique que la sur-densité observée dans les profils de densité électronique des monocouches de fragments C-EC1-5His seuls est peu marquée. Le profil possède une forme rectangulaire à l'interface protéine-eau, ce qui indique que la monocouche est très organisée latéralement.

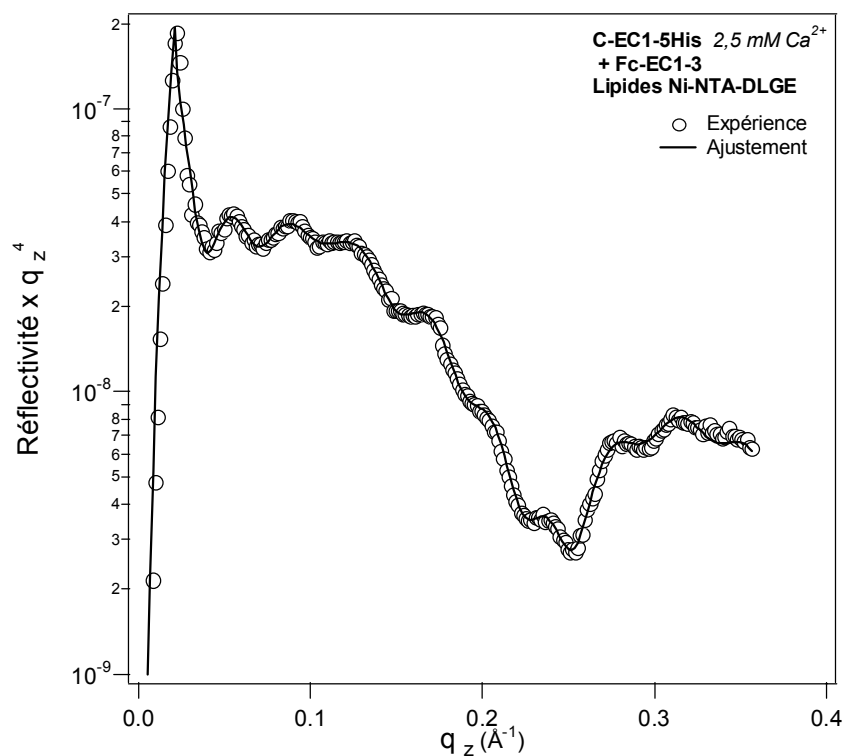
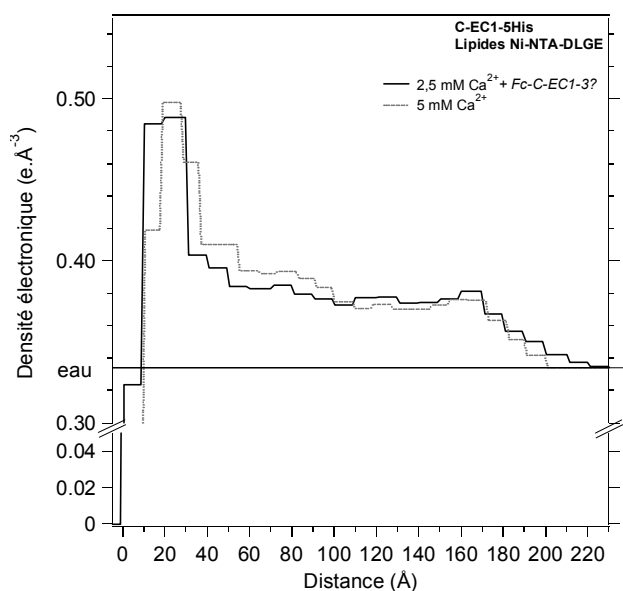
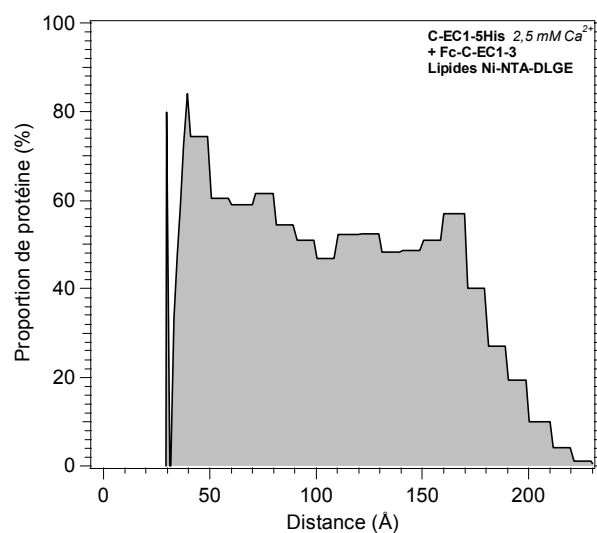


Figure 81 Analyse d'une tentative d'interaction entre fragment court et la C-cadhérine entière : C-EC1-5His et le fragment Fc-C-EC1-3. Conditions Expérimentales initiales : [C-EC1-5His] = 0,5 μ M, lipides Ni-NTA-DLGE.



a)



b)

Figure 82 : (a) Profil de densité électronique et (b) fraction de protéine dans la couche correspondant à la Figure 81.

Discussion : présence de complexes mixtes ?

Le profil de densité électronique observé pour la monocouche de fragments mixtes est très similaire à celui présenté précédemment pour une monocouche de fragments C-EC1-5His seuls (voir paragraphe IV.2.2.1). Or, si des complexes mixtes s'étaient ancrés aux lipides, le profil de densité électronique attendu serait très différent de celui de la couche de fragments C-EC1-5His seuls. En effet, les domaines Fc mesurent environ 10 nm [Leckband, communication privée], et une monocouche contenant des fragments Fc-C-EC1-3 serait par conséquent plus épaisse que la monocouche de fragments C-EC1-5His seuls. L'épaisseur de la monocouche observée est de 16 nm, c'est-à-dire similaire à celle d'une monocouche de fragments C-EC1-5His seuls.

Une hypothèse peut être formulée pour expliquer pourquoi la structure de la monocouche après injection du fragment court Fc-C-EC1-3 est presque identique à la couche de référence. Les fragments comprenant les domaines Fc des immunoglobulines sont utilisés par l'équipe de B. Gumbiner pour étudier les affinités entre domaines. A ce jour, aucune interaction entre fragments différents n'a été observée. L'affinité entre les fragments de cadhérines est plus grande entre fragments du même type qu'entre fragments de types différents. Or, nous avons injecté une quantité de fragments Fc-C-EC1-3 inférieure à la quantité de fragment C-EC1-5His. Pour favoriser les interactions entre fragments de différents types, il serait nécessaire d'utiliser un large excès du fragment court par rapport au fragment entier, afin de déplacer l'équilibre entre les complexes mixtes de fragments et les fragments séparés dans la direction de la formation de complexes mixtes.

Nous considérons l'hypothèse selon laquelle la monocouche considérée est composée uniquement de fragments C-EC1-5His. Après l'injection des fragments courts, la monocouche a incubé pendant 27 heures. L'évolution de la couche pourrait avoir favorisé l'organisation des fragments C-EC1-5His au sein de la monocouche. La présence d'une concentration élevée en calcium dans la sous-phase permet de supposer qu'il existe des interactions *cis* et *trans* entre ces fragments. La Figure 82 b) présente la proportion de cadhérine dans la monocouche ancrée aux lipides. Elle indique que la monocouche est composée d'une densité moyenne en fragment d'environ 50% et que le profil de densité électronique est relativement plat. Cette observation indique que les fragments forment une monocouche très homogène. Il est possible que des interactions *cis* et *trans* soient à l'origine d'une organisation latérale des fragments conduisant à un tel profil de densité électronique.

IV.2.5 Conclusion de l'étude du fragment C-EC1-5His de C-cadhérine

Par l'étude de monocouches de fragments C-EC1-5His avec les méthodes couplées d'ellipsométrie et de réflectivité X, nous avons cherché à mieux comprendre le mécanisme d'interaction entre les fragments extracellulaires de cadhérine.

Nous avons montré dans un premier temps que les fragments de C-cadhérine immobilisés à la surface de l'eau par greffage à une monocouche de lipides li-

gands étaient fonctionnels. Pour cela, nous avons mis en évidence une dépendance de la densité massique de surface de ces monocouches de la concentration en calcium environnante. Cette dépendance reflète l'assemblage en complexes antiparallèles des fragments de cadhérine en accord avec la littérature [Takeichi 1991, Pertz 1998].

En particulier, l'absence de calcium déstabilise totalement la monocouche, comme nous l'avons observé à la fois par ellipsométrie et réflectivité X. Lorsque la concentration en calcium est élevée, les monocouches de fragments C-EC1-5His sont denses. Cette observation peut être interprétée comme une organisation partielle des fragments C-EC1-5His au sein de la couche et suggère que des interactions entre fragments aient lieu. De plus, les complexes ancrés aux lipides peuvent être dissociés par l'appauvrissement de la solution constituant la sous-phase en calcium. Cette dépendance du calcium semble indiquer qu'une proportion notable de complexes antiparallèles de fragments de C-cadhérine est ancrée aux lipides.

La structure des monocouches de fragments C-EC1-5His perpendiculaire à la surface indique une épaisseur d'environ 16 nm. Compte tenu de la longueur du fragment évaluée à partir de sa structure cristallographique [Boggon 2002], ce résultat montre que les fragments ne sont pas alignés suivant la normale à la surface et suggère une courbure et une inclinaison des fragments au sein de la monocouche. Des surplus de densité aux interfaces lipides/protéines et protéines/sous-phase pourraient correspondre à des interactions entre domaines N-terminaux (EC1 et/ou EC2). Combiné avec l'observation de la dissociation de complexes *trans* par appauvrissement de la sous-phase en calcium ce résultat indique que des complexes *cis* et *trans* coexistent à la surface. Cependant, l'épaisseur de la monocouche n'est pas compatible avec des interactions *trans* régies par les domaines N-terminaux seuls. Un tel complexe mesurerait en effet entre 38,5 nm [Boggon 2002] et 40 nm [Sivasankar2001b]. Cela suggère que les complexes *trans* présents dans la couche sont très fortement interdigités. Le modèle proposé par S. Sivasankar *et al.* (voir la Figure 9) met en jeu des interactions entre fragments totalement interdigités. Les travaux récents de M. Renaud-Young *et al.* ont montré que le domaine EC1 interagit avec un domaine de cadhérine voisine autre que le domaine EC1 [Renaud-Young 2002], suggérant également un enchevêtrement des fragments extracellulaires de cadhérine.

Notre étude d'assemblage entre fragments n'est pas concluante. Il n'est pas possible de distinguer l'auto-assemblage de fragments C-EC1-5His de l'interaction entre les fragments et les lipides (paragraphe IV.2.4.1). De même, l'expérience mettant en jeu le mélange de fragments C-EC1-5His et Fc-C-EC1-3 a montré que ce dernier ne s'est pas intégré à la monocouche de fragment C-EC1-5His (paragraphe IV.2.4.2). Il n'a donc pas été possible de localiser l'interaction entre fragments extracellulaires de cadhérine le long des domaines du fragment C-EC1-5His. Cette étude préliminaire serait à poursuivre en particulier en utilisant d'une part des fragments de cadhérine ne comportant pas d'étiquette histidine afin de supprimer toute interaction lipide-protéine lors d'une deuxième injection sous une monocouche préformée, et d'autre part en ayant recours à de

plus grande quantité de fragments courts de compositions en domaines extracellulaires variées afin de favoriser les interactions mixtes.

En conclusion, l'ensemble de cette étude nous permet de faire quelques hypothèses sur le comportement des fragments extracellulaires de C-cadhérine. Les fragments C-EC1-5His sont ancrés aux lipides sous forme de complexes antiparallèles totalement interdigités. Cela est *a priori* opposé au modèle de complexes mettant en jeu les domaines extracellulaires EC1 et EC2 présentés dans la littérature par de nombreuses équipes (notamment [Boggon 2002], [Shapiro 1995], [Pertz 1998]). Cependant, cette hypothèse ne remet pas en cause l'existence de tels complexes au cours de la formation d'une jonction entre deux cellules. L'interaction entre les domaines extracellulaires de cadhérine pourrait se faire en plusieurs étapes, dont la première serait la formation d'un complexe antiparallèle relié au niveau des domaines N-terminaux. La dernière étape de ce processus serait un complexe anti-parallèle au sein duquel les fragments se recouvriraient totalement. Cette hypothèse est en accord avec les travaux plus récents de l'équipe de D. Leckband [Sivasankar 2002] et de Renaud-Young *et al.* [Renaud-Young 2002].

IV.3 Etude du fragment VE-EC1-4His de VE-cadhérine

Nous présentons dans cette section les résultats concernant le fragment de VE-cadhérine VE-EC1-4His. Cette étude a été effectuée en collaboration avec l'équipe de D. Gulino de l'Institut de Biologie Structurale (I.B.S.), et deux de ses étudiantes S. Bibert et R. Al-Kurdi. Avant de travailler sur le fragment VE-EC1-4His, plusieurs constructions ont été imaginées. Tous les fragments ont été produits par S. Bibert, R. Al-Kurdi et E. Concord (I.B.S.).

Lors des premiers essais d'adsorption de VE-cadhérine à des monocouches lipidiques, nous avons choisi de greffer la protéine sur des lipides fonctionnalisés à leur tête polaire par un groupement maléimide. Pour cela, une construction exprimant un fragment comportant les modules extracellulaires EC1 à EC4 plus quelques acides aminés du domaine EC5 ainsi qu'une cystéine en position C-terminale a été produite. Le greffage sur les lipides se fait par une réaction chimique mettant en jeu l'atome de soufre de la cystéine et le groupement maléimide du lipide. Cette méthode nécessite d'abord une réduction des ponts disulfures entre cystéines. Plusieurs tentatives pour obtenir de cette manière des couches denses du fragment de VE-cadhérines sont restées vaines. Nous n'avons pas observé d'influence du calcium sur ces couches de VE-cadhérine. De plus, une forte adsorption non spécifique de ces fragments a été observée sous une monocouche de lipides diluants DOPC.

Après avoir imaginé de produire une protéine de fusion entre la VE-cadhérine et la streptavidine afin d'utiliser des lipides biotinylés, nous avons opté pour une construction possédant une étiquette polyhistidine en position C-terminale. Cette construction est similaire à celle de la C-cadhérine, ce qui nous a permis de travailler avec les mêmes lipides chélatant l'ion nickel. Les fragments de VE-cadhérine sont exprimés en grande quantité par des bactéries *E. Coli*, mais ces dernières ne peuvent pas élaborer les ponts disulfures car leur cytoplasme est réducteur. Ainsi, pour contourner cet inconvénient, un fragment recombinant composé des quatre modules extracellulaires EC1 à EC4 de la VE-cadhérine a été produit, le module EC5 comportant deux ponts disulfures²³.

Une troisième stratégie est en cours afin d'exprimer la partie extracellulaire entière de la VE-cadhérine. Une étiquette polyhistidine est accolée en position C-terminale aux cinq modules extracellulaires EC1 à EC5. Ce fragment qui est glycosylé est exprimé dans des cellules d'insecte infectées par un baculovirus exprimant le gène de la protéine.

Les masses des fragments de cadhérines C-EC1-5His et VE-EC1-4His sont respectivement de 70kDa et de 48,9kDa. La différence de masse moléculaire est due au module extracellulaire supplémentaire EC5 et à la présence de polysaccharides sur le fragment de C-cadhérine. Le rôle des polysaccharides dans les interactions entre cadhérines est non élucidé à l'heure actuelle. Néanmoins, il

²³ Le fragment de C-cadhérine comporte les cinq domaines extracellulaires car il est exprimé dans des cellules eucaryotes.

est possible que les interactions entre fragments de VE-cadhérine soient différentes de celles régies par les fragments de C-cadhérine du fait de la présence des polysaccharides sur ces derniers.

Des études menées par D Gulino et ses collaborateurs ont montré que les fragments de VE-cadhérine VE-EC1-4 s'auto-associent en solution sous forme d'hexamères [Legrand 2001]. D'après ce modèle, les molécules de VE-cadhérines seraient associées de manière anti-parallèle formant ainsi un tube creux (voir la Figure 8, Chapitre II). Au sein de l'hexamère, deux fragments VE-EC1-4His s'associeraient d'une manière anti-parallèle, les modules EC3 étant face à face et les modules EC2 et EC4 interagissant entre eux. Ce modèle est compatible avec les résultats de S. Sivasankar *et al.* obtenus sur le fragment C-EC1-5His de C-cadhérine par mesure de force de surface [Sivasankar2000a, Sivasankar2000b]. En particulier, les auteurs ont montré que deux fragments extracellulaires de C-cadhérine antiparallèles interagissent en étant décalées de 1,5 (voir Figure 9, Chapitre II). Ce type d'association est proche du modèle proposé par D. Gulino *et al.* décrivant l'interaction des VE-cadhérines au sein de l'hexamère. Toutefois, dans ce modèle, l'hypothèse selon laquelle les molécules s'auto-associent d'une manière antiparallèle n'a pas encore été démontré et il est possible que les cadhérines soient associées de manière parallèle. Un des objectifs de ce travail était de répondre à cette question.

Nous avons montré dans la section précédente que les fragments de C-cadhérine forment à l'interface lipide-eau des complexes anti-parallèles dépendants du calcium. Dans cette section, nous étudions la formation de monocouches de fragments de VE-cadhérine ainsi que la dépendance de ces monocouches avec la présence d'ions Ca^{2+} . Les questions que nous nous posons sont les suivantes :

- Les fragments de VE-cadhérine forment-ils des complexes antiparallèles dépendant du calcium?
- Quelle est la structure des monocouches fragments de VE-cadhérine, la taille de la molécule, et comment cette structure est-elle comparable à celle des fragments de C-cadhérine?
- Quelle est la structure de complexes composés de fragments de VE-cadhérine de différentes tailles? Est-il possible de localiser les interactions entre domaines extracellulaires le long de la molécule?

Pour répondre à ces questions, nous avons d'abord étudié par ellipsométrie l'adsorption du fragment de VE-cadhérine VE-EC1-4His à la monocouche de lipide en fonction de la concentration en calcium de la sous-phase. Puis, nous avons déterminé, par réflectivité des rayons X, la structure de la monocouche constituée de fragments VE-EC1-4His selon un axe perpendiculaire à la surface. Le profil de densité électronique obtenu peut alors être comparé à celui de monocouche du fragment de C-cadhérine C-EC1-5His. Enfin, pour identifier les interactions mises en jeu entre les fragments de VE-cadhérine le long de la molécule, nous avons étudié par réflectivité X l'adsorption aux lipides de trois mélanges composés de fragments de VE-cadhérine de différentes tailles: les fragments VE-EC1-3, VE-EC2-4 et VE-EC3-4 (voir la Figure 11b)).

IV.3.1 Interaction non-spécifique

Comme le fragment de C-cadhérine C-EC1-5His que nous avons étudié précédemment, le fragment VE-EC1-4His possède une étiquette polyhistidine en position C-terminale lui permettant d'interagir avec l'ion nickel chélaté par les lipides ligands. Il est nécessaire de vérifier que les protéines s'ancrent aux lipides via une interaction mettant en jeu l'étiquette polyhistidine et l'ion nickel afin de s'assurer que les cadhérines formant la monocouche sont orientées d'une façon équivalente à l'orientation des cadhérines à la surface des cellules endothéliales.

Dans cette section, nous évaluons au préalable la quantité de protéines qui se dépose sous les lipides sans qu'aucune interaction entre l'ion nickel et l'étiquette polyhistidine ait lieu, ce qui est couramment appelé l'adsorption non-spécifique. Pour cela, nous avons d'abord étudié par ellipsométrie l'adsorption du fragment VE-EC1-4His à une monocouche de lipides diluants DOPC. Puis, par réflectivité des rayons X, l'évolution de la structure d'une monocouche du mélange de lipides diluants DOPS:DOPE (1:7) sous lequel est injecté le fragment de VE-cadhérine VE-EC1-4His.

IV.3.1.1 Ellipsométrie

L'évolution d'une monocouche de lipides diluants DOPC est suivie par ellipsométrie après l'injection de fragments VE-EC1-4His dans la sous-phase. La concentration en calcium de la sous-phase était de 4 mM CaCl_2 . Le dépôt des lipides à la surface de l'eau a été effectué au temps $t=5$ min et l'injection des protéines environ 1 heure après.

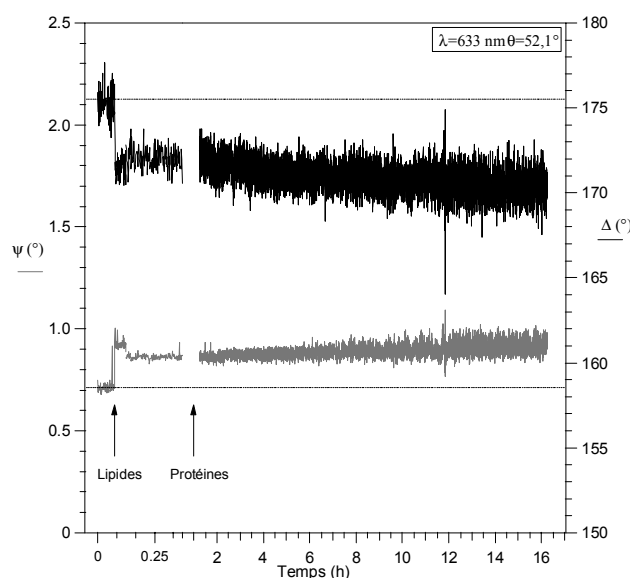


Figure 83 : Suivi ellipsométrique de l'injection du fragment VE-EC1-4His sous les lipides ligands DOPC (ψ en gris, Δ en noir). L'échelle de temps est agrandie entre $t=0$ et $t=15$ minutes pour indiquer le dépôt des lipides. Conditions Expérimentales: $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,5 \mu\text{M}$, $[\text{CaCl}_2] = 4 \text{ mM}$.

Le suivi des angles ellipsométriques ψ et Δ est présenté sur la Figure 83. Les mesures des angles ψ et Δ sont assez bruitées, mais après 16 heures d'incubation du fragment de VE-cadhérine sous la monocouche de lipides, leurs valeurs moyennes n'ont pas changé par rapport aux valeurs mesurées sur la couche de

lipides seuls. La masse apparente des lipides ne peut pas être calculée à partir des angles ψ et Δ par l'équation de de Feijter [de Feijter 1978] puisque l'incrément d'indice n'est pas défini pour les lipides. Cette expérience indique que très peu de protéine s'est adsorbée aux lipides.

IV.3.1.2 Réflectivité X

Une solution de fragments VE-EC1-4His a été injecté sous une monocouche du mélange de lipides diluants DOPS:DOPE (1:7). La concentration finale en protéine était de $0,5 \mu\text{M}$ et la concentration en ions Ca^{2+} de la solution tampon de 5 mM . Ce mélange de lipides diluants a été utilisé car sa composition et la structure de ces lipides sont très proches des lipides employés pour la cristallisation à deux dimensions de la VE-cadhérine (par R. Al-Kurdi, I.B.S.), à savoir le mélange de lipides ligand-diluant Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7).

La Figure 84 présente les courbes de réflectivité mesurées sur la monocouche de lipides seuls et sur le système lipide+protéine. Une légère différence apparaît dans la position et l'amplitude du minimum principal attribué aux lipides. La courbe des lipides seuls peut être décrite à l'aide d'un modèle à deux couches calculé par le programme Parratt32, celle de la couche lipo-protéique a été ajustée par un modèle à trois couches. Ces deux modèles sont présentés sur la Figure 85.

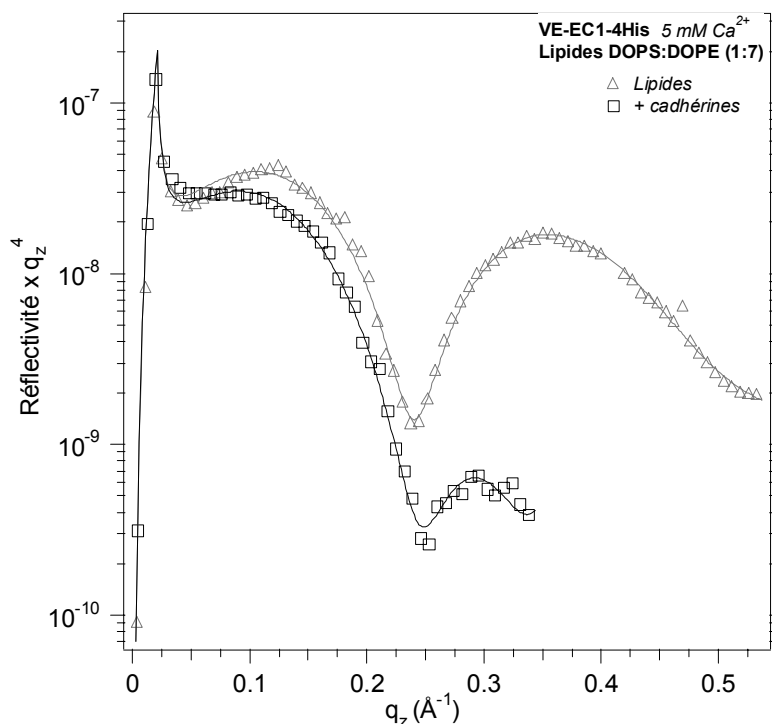


Figure 84 : Comparaison des courbes de réflectivité X mesurées à la surface de lipides diluants seuls et avec le fragment de VE-cadhérine VE-EC1-4His. Conditions Expérimentales : $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,5 \mu\text{M}$, $[\text{CaCl}_2] = 5\text{mM}$. Lipides DOPS:DOPE(1:7).

Les deux modèles sont assez différents en ce qui concerne la couche attribuée à la tête polaire des lipides. La densité électronique de cette couche est plus élevée pour les lipides seuls que pour la couche lipo-protéique. De plus, le modèle

lipide+protéine est composé d'une troisième couche qui constitue une légère sur-épaisseur près de la tête polaire des lipides. En moyenne sur plusieurs ajustements effectués, cela correspond à une épaisseur de 0,64 nm.

Cette couche est trop fine pour correspondre au fragment de VE-cadhérine. En effet, d'après des clichés de microscopie électronique, la VE-cadhérine mesure environ 4 nm de diamètre et le fragment VE-EC1-4His 18 nm de long [Legrand 2001]. La sur-densité observée ne peut donc pas correspondre à une monocouche de fragments de VE-cadhérine ancrés aux lipides soit par une liaison histidine-nickel, soit par une adsorption non spécifique conduisant à des protéines couchées parallèlement à la couche de lipides. Il se pourrait que la protéine ait pénétré la monocouche de lipide. La protéine pourrait s'être dénaturée à l'interface air-eau, ce qui conduirait à une couche très fine. Cela pourrait expliquer la différence de densité électronique au niveau des têtes polaires.

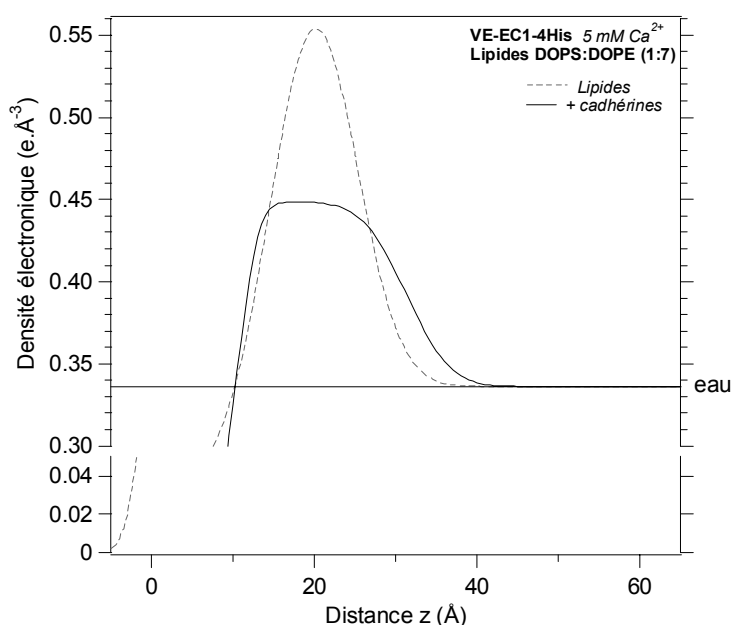


Figure 85 : Comparaison des profils de densité électronique calculés pour les courbes présentées sur la Figure 84.

En conclusion, les mesures d'ellipsométrie et de réflectivité X présentées indiquent qu'une quantité négligeable de fragments VE-EC1-4His s'est adsorbée de manière non spécifique à la monocouche des lipides diluants. Dans la suite de cette section, nous présentons des expériences d'ellipsométrie ou de réflectivité X dans lesquelles sont utilisés des fragments comportant une étiquette histidine et des lipides ligands. Nous disposerons donc *a priori* d'une monocouche de protéines orientées de la même manière que les cadhérines à la surface d'une cellule, c'est-à-dire le domaine EC4 lié aux lipides et le domaine EC1 dirigé vers la sous-phase.

IV.3.2 Etude ellipsométrique de monocouches du fragment VE-EC1-4His

Nous étudions dans cette section le comportement du fragment VE-EC1-4His en fonction de la concentration en calcium de la sous-phase. Ces expériences ont été réalisées avec le mélange de lipides ligands-diluants Ni-NTA-DOGS :DOPE (1 :7), et avec le même lot de fragment.

IV.3.2.1 Adsorption du fragment VE-EC1-4His dépendante du calcium

L'objectif de cette étude est de déterminer si l'adsorption de fragments sur les lipides dépend de la concentration de la sous-phase en calcium et du pourcentage d'hexamères et de monomères injectés. La forme hexamérique des fragments de VE-cadhérine existe pour des concentrations en protéines et en calcium élevées. Lorsque les concentrations en protéines et en calcium diminuent, les interactions entre fragments n'ont plus lieu et les fragments sont sous forme monomérique.

Expérience A : 95 % d'hexamères en solution, $[Ca^{2+}] = 4 \text{ mM}$

Protocole de l'expérience A

Le fragment VE-EC1-4His a été injecté sous une monocouche du mélange de lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7). La concentration initiale de la solution de fragment est de $22 \mu\text{M}$, ce qui équivaut à un pourcentage d'hexamères de 95% [Legrand 2001]. La concentration finale en solution des fragments est de $0,5 \mu\text{M}$. Le suivi ellipsométrique de l'adsorption des protéines sur les lipides est présenté sur la Figure 86. Le temps est compté à partir du dépôt des lipides et les fragments VE-EC1-4His sont injectés au temps $t=40$ minutes.

Résultats de la mesure

La cinétique d'adsorption du fragment sur la couche de lipides montre une stabilisation des angles ellipsométriques qui correspond à une saturation de la monocouche de protéine, trois heures après l'injection des protéines (Figure 86). L'adsorption se fait en deux étapes, comme nous l'avons remarqué dans le cas de l'adsorption aux lipides du fragment de C-cadhérine (paragraphe IV.2.2.1). Dans une première étape rapide de 15 minutes après l'injection des protéines, l'angle Δ atteint 91% de sa valeur maximale, et l'angle ψ 80%. Puis, nous observons un régime lent de saturation et probablement de réarrangement des protéines dans la couche.

Les plages de points manquants dans la cinétique d'adsorption sont les instants où ont été enregistrées les courbes ellipsométriques angulaires grâce auxquelles nous calculons la quantité de masse adsorbée apparente par l'équation de de Feijter (voir Chapitre I). Trois heures après l'injection du fragment VE-EC1-4His, la densité massique surfacique apparente s'élève à $9,4 \text{ mg/m}^2$ d'après l'analyse des variations angulaires de ψ et de Δ présentés sur la Figure 87.

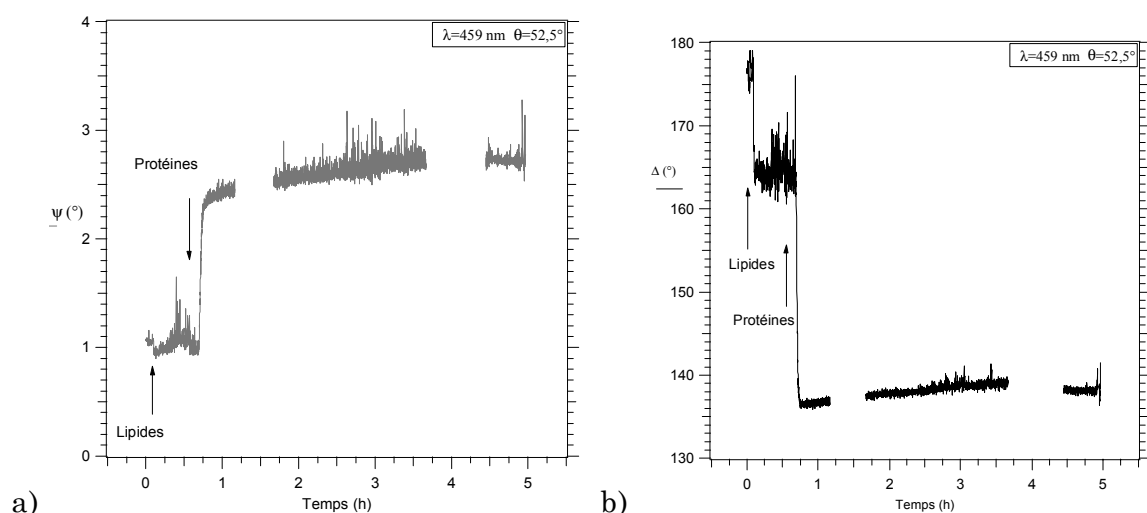


Figure 86 : *Expérience A* : Adsorption du fragment VE-EC1-4His à une monocouche de lipides Ni-NTA-DOGS :DOPE (1 :7) mesurée par ellipsométrie : évolution des angles ψ (a) et Δ (b). Les flèches indiquent le dépôt des lipides et l'injection en sous-phase du fragment VE-EC1-4His. Conditions Expérimentales : $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,5 \mu\text{M}$, $[\text{CaCl}_2] = 4 \text{ mM}$.

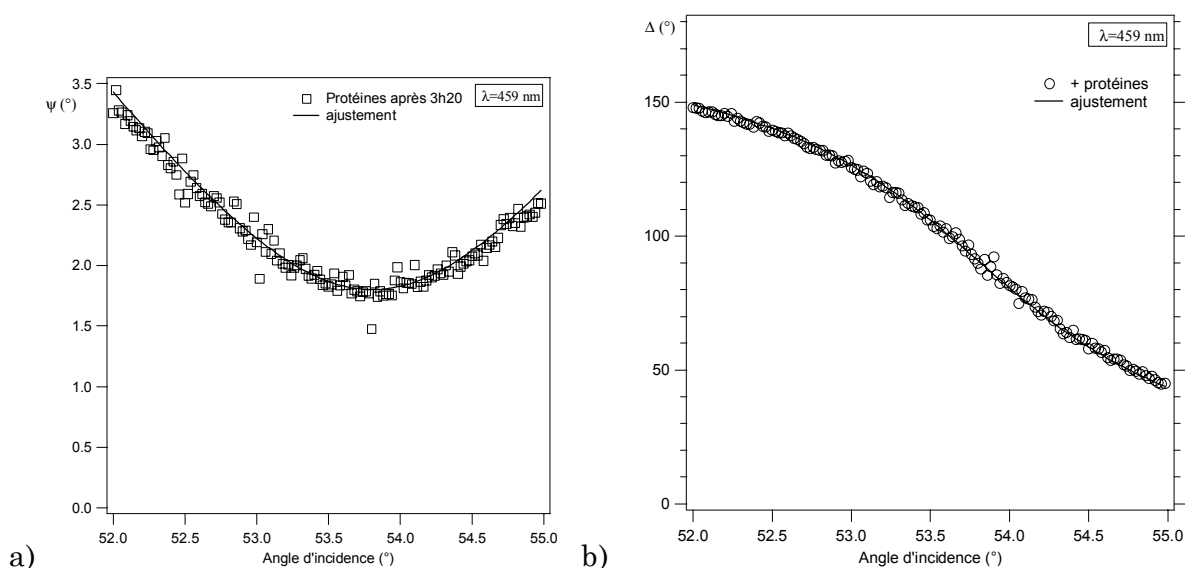


Figure 87 : Variations des angles ψ (a) et Δ (b) en fonction de l'angle d'incidence et courbes calculées pour la monocouche lipides+cadhérines. Conditions Expérimentales : $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,5 \mu\text{M}$, $[\text{CaCl}_2] = 4 \text{ mM}$, lipides Ni-NTA-DOGS :DOPE (1 :7).

Comparaison avec le fragment C-EC1-5His

La masse apparente de fragments C-EC1-5His ancrés aux lipides DLGE a été évaluée à $10,1 \text{ mg/m}^2$ par ellipsométrie pour une concentration de la sous-phase en calcium de 5 mM (voir le paragraphe IV.2.2.1). La masse apparente de fragment VE-EC1-4His ancrée au mélange de lipides ligands-diluants représente donc 93 % de celle obtenue avec le fragment C-EC1-5His ancré à des lipides ligands seuls. Or, le fragment VE-EC1-4His a une masse égale aux $3/4$ de celle du fragment de C-cadhérine C-EC1-5His. De plus, sa longueur est estimée à 18 nm lorsque ses quatre domaines extracellulaires sont alignés [Legrand 2001], ce qui représente $3/4$ de la longueur de la C-cadhérine estimée à $23,5 \text{ nm}$ si les cinq

domaines extracellulaires sont alignés. Nous pouvions par conséquent nous attendre à mesurer une masse apparente surfacique égale environ aux 3/4 de la masse de fragment C-EC1-5His ancré dans des conditions similaires. La monocouche formée par le fragment VE-EC1-4His est donc relativement plus dense que celle formée par le fragment C-EC1-5His.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette observation. Tout d'abord, le fragment de C-cadhérine que nous avons étudié est glycosylé contrairement au fragment de VE-cadhérine. La présence des polysaccharides, qui rend la protéine plus proche de sa forme native, est connue des cristallographes pour empêcher les protéines de cristalliser, puisqu'ils gênent l'empilement compact des protéines. Il est possible que les polysaccharides jouent un tel rôle dans la monocouche de fragments de C-cadhérine. De plus, l'adsorption des protéines aux lipides peut varier en fonction de leur nature, c'est-à-dire si la couche est composée de lipides ligands seuls ou de mélange de lipides ligands et diluants. Enfin, la solution de fragment VE-EC1-4His injectée contenait un pourcentage d'hexamères de 95 %. Or, d'après le modèle de P. Legrand *et al.* [Legrand 2000], les hexamères de VE-cadhérines pourraient interagir de manière à former un réseau à la surface des cellules. Si les fragments de VE-cadhérine sont ancrés aux lipides sous la forme d'hexamères, il est possible qu'ils interagissent entre eux et forment une couche compacte.

Cependant, une comparaison quantitative entre les deux protéines est délicate. Tout d'abord, rappelons que nous avons choisi une valeur de 0,19 pour l'incrément d'indice $\frac{dn}{dc}$, bien qu'il soit différent d'une protéine à l'autre. La littérature fait état d'une variabilité de 10% sur ce rapport, ce qui implique 10% d'incertitude sur la valeur de la masse adsorbée apparente estimée ici (voir le Chapitre I et [Handbook1960]).

Expérience B : 80% d'hexamères en solution, $[Ca^{2+}] = 0,5 \text{ mM}$

Protocole de l'expérience B

Nous considérons ici une monocouche de fragments VE-EC1-4His élaborée en présence d'une concentration en calcium de 0,5 mM dans la sous-phase. Le dépôt du mélange de lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7) est effectué au temps $t=5 \text{ min}$. Les fragments de VE-cadhérine sont injectés au temps $t=1,5 \text{ h}$ à une concentration finale en solution de 0,5 μM .

D'après P. Legrand *et al.*, les fragments de VE-cadhérine doivent être conservés dans une solution contenant une concentration en calcium minimale de 0,5 mM pour éviter leur dénaturation [Legrand 2001]. Pour diminuer la proportion d'hexamères par rapport aux monomères, les auteurs ont montré qu'une solution de fragments VE-EC1-4His de concentration élevée doit être diluée et maintenue au moins 24 heures à température ambiante. Nous avons dilué dix fois une solution de fragment VE-EC1-4His de concentration initiale 22 μM en présence d'une concentration en calcium de 5 mM. La concentration en fragment de la solution initiale injectée sous les lipides est de 2,2 μM , ce qui signifie que les fragments se trouvent, lorsque l'équilibre est atteint, à 80% sous forme d'hexamères.

Résultats de la mesure et discussion

La Figure 88 présente la cinétique d'adsorption des fragments VE-EC1-4His au le mélange de lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7). L'adsorption est différente de l'expérience A décrite précédemment où une adsorption en deux étapes était observée (voir la Figure 86). Ici, les variations de ψ et de Δ peuvent être modélisées par une exponentielle en fonction du temps t de la forme $\alpha + \beta \cdot \exp(-t/\tau)$, où τ est un temps caractéristique de l'adsorption et α et β sont des constantes. Les courbes calculées sont superposées aux données expérimentales sur la Figure 88. Le temps caractéristique d'adsorption est de 48 minutes pour ψ et de 20 minutes pour Δ . La différence de temps caractéristique d'adsorption pour les angles ellipsométriques ψ et Δ met en évidence la non-linéarité des variations de ces angles avec l'augmentation de la densité de protéines en surface. Par ailleurs, la concentration initiale en fragment est dix fois inférieure dans cette expérience que dans l'expérience A, ce qui explique que le temps caractéristique d'adsorption est par conséquent plus long.

La différence entre les temps caractéristiques de stabilisation respectifs de ψ et de Δ vient du fait que les variations de ψ et de Δ ne sont pas linéaires avec les variations d'épaisseur ou d'indice pour des épaisseurs telles que la taille du fragment, comme nous l'avons mentionné dans le Chapitre I. Le temps caractéristique de stabilisation de ψ est deux fois plus long que celui de Δ . Les temps caractéristiques ne sont donc pas propres au phénomène d'adsorption de la protéine aux lipides, mais aux variations des angles ellipsométriques. Cela justifie le fait que nous nous intéressions à la fois aux variations simultanées de ψ et de Δ et que nous mesurons à partir des courbes ellipsométriques angulaires pour déterminer la quantité de protéines adsorbées aux lipides.

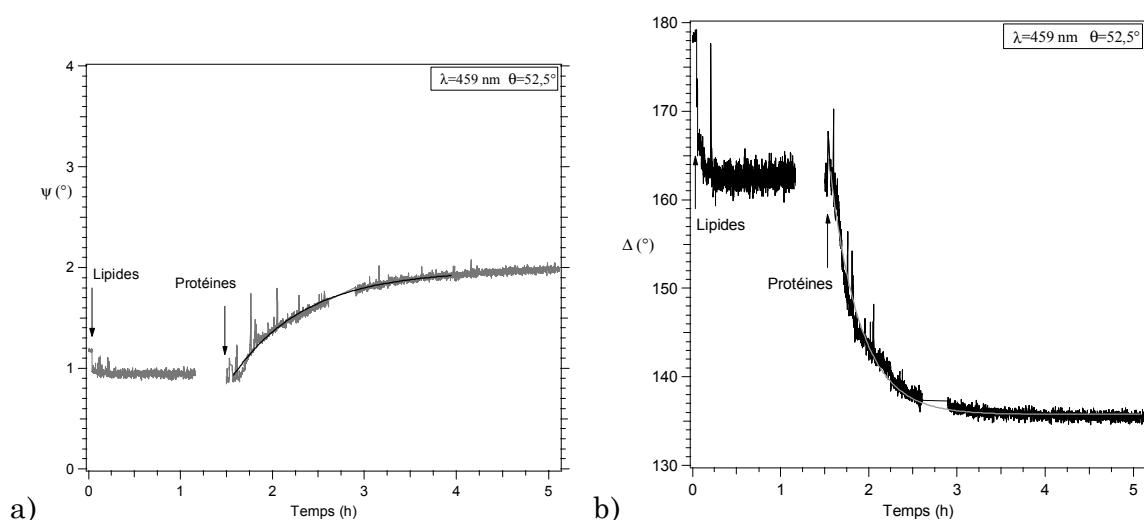


Figure 88 : *Expérience B* : Adsorption du fragment de VE-cadhérine VE-EC1-4His à une monocouche de lipides Ni-NTA-DOGS :DOPE (1 :7) : évolution des angles ψ (a) et Δ (b). Les flèches indiquent le dépôt des lipides et l'injection de la VE-cadhérine dans la sous-phase. Sur chaque figure sont représentés les données expérimentales respectives de ψ et Δ et des ajustements par des exponentielles. Conditions Expérimentales : [VE-EC1-4His] = 0,5 μM , [CaCl₂] = 0,5 mM.

La masse apparente de fragments VE-EC1-4His en surface est déterminée à partir d'une mesure ellipsométrique angulaire présentée sur la Figure 89. Pour

comparaison, apparaissent également sur cette figure les variations de ψ et Δ en fonction de l'angle d'incidence et les ajustements correspondants pour la monocouche de lipides seuls. Après une incubation de 4 h 40 min, qui correspond à la stabilisation des deux angles ellipsométriques, la masse apparente s'élève à 7,3mg/m². La quantité de fragments ancrés aux lipides représente donc 78% de la masse adsorbée apparente de l'expérience A.

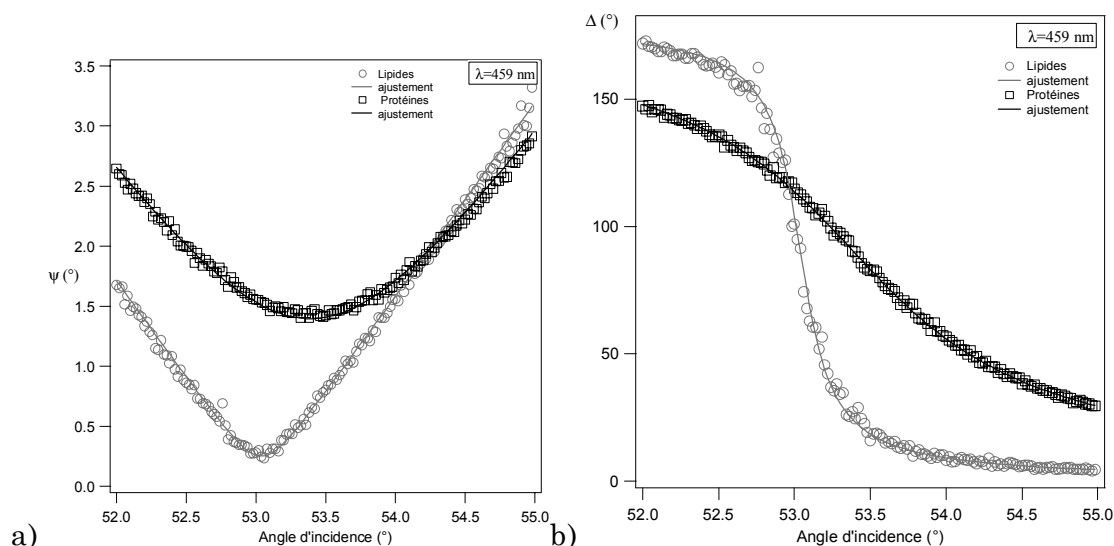


Figure 89 : *Expérience B* : Variations des angles ψ (a) et Δ (b) en fonction de l'angle d'incidence et courbes calculées pour la monocouche de lipides seuls et la monocouche lipides+cadhérines. Conditions Expérimentales : [VE-EC1-4His] = 0,5 μ M, [CaCl₂] = 0,5 mM.

Expérience C : 20% d'hexamères, [Ca²⁺] = 0,5 mM

Protocole de l'expérience

Pour atteindre une proportion d'hexamères de 20%, nous avons dilué cent fois une solution de fragment VE-EC1-4His de concentration initiale 22 μ M et de concentration en calcium 0,5 mM, puis attendu 30 heures pour atteindre l'équilibre entre monomères et hexamères. La solution diluée de fragment VE-EC1-4His a été injectée sous une monocouche du mélange de lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7). La concentration initiale de la solution de fragment VE-EC1-4His est de 0,22 μ M. A cause de cette faible concentration de la solution de fragment, nous avons dû déposer les lipides sur la solution protéique, au lieu d'injecter la solution de protéine concentrée sous la monocouche de lipides, comme pour les autres expériences. La concentration finale des fragments en solution est donc de 0,22 μ M. Le temps est compté à partir du dépôt des lipides sur la solution de fragments VE-EC1-4His.

Résultats de la mesure et discussion

La Figure 90 présente les cinétiques d'adsorption des fragments VE-EC1-4His aux lipides. La cinétique d'adsorption est bien plus lente que celle des expériences précédentes A et B. Les temps caractéristiques de stabilisation des angles ψ et Δ sont respectivement 4h 16min et 2h 8min. Ils sont donc en moyenne six fois plus longs que les temps caractéristiques déterminés pour l'adsorption des frag-

ments VE-EC1-4His en solution initiale de concentration $2,2 \mu\text{M}$. Le temps caractéristique de stabilisation de ψ est deux fois plus long que celui de Δ comme nous l'avons remarqué dans l'expérience *B*.

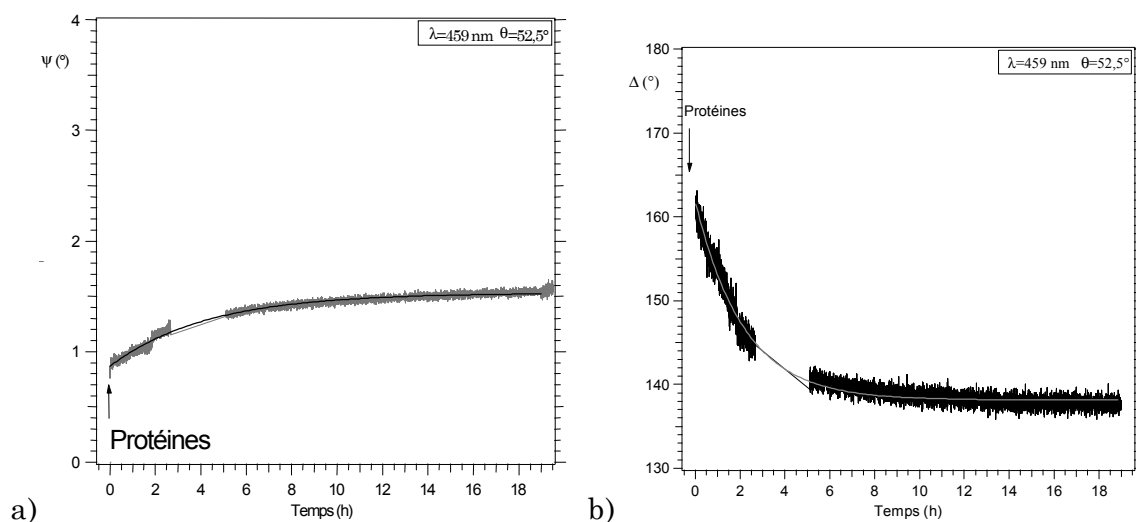


Figure 90 : *Expérience C* : Evolution des angles ψ (a) et Δ (b) lors de l'adsorption du fragment de VE-cadhérine VE-EC1-4His à une monocouche de lipides Ni-NTA-DOGS :DOPE (1 : 7). Les flèches indiquent l'injection de la VE-cadhérine dans la sous-phase. Sur chaque figure sont représentés les données expérimentales respectives de ψ et Δ et des ajustements par des exponentielles. Conditions Expérimentales : $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,22 \mu\text{M}$, $[\text{CaCl}_2] = 0,5 \text{ mM}$.

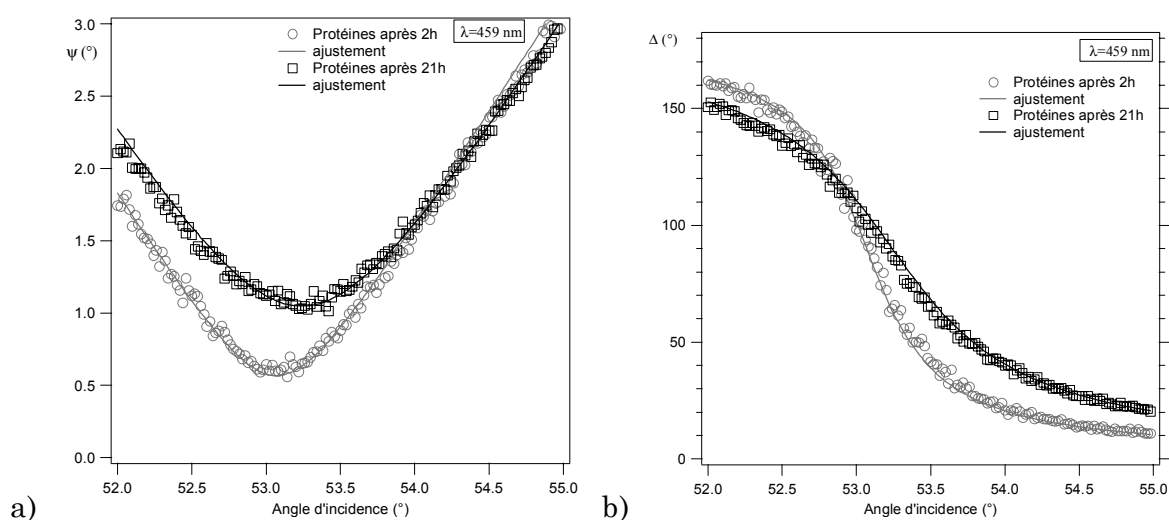


Figure 91 : *Expérience C* : Variations des angles ψ (a) et Δ (b) en fonction de l'angle d'incidence et courbes calculées pour la monocouche de lipides seuls et la monocouche lipides+cadhérines. Conditions Expérimentales : $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,22 \mu\text{M}$, $[\text{CaCl}_2] = 0,5 \text{ mM}$.

La Figure 91 présente les variations des angles ellipsométriques ψ et Δ en fonction de l'angle d'incidence pour la monocouche de fragments VE-EC1-4His après 1 heure et après 21 heures d'incubation sous les lipides. L'analyse des ajustements de ces courbes indique que la masse apparente de cadhérine en surface est de $2,6 \text{ mg/m}^2$ après 1 heure et de $5,2 \text{ mg/m}^2$ après 21 heures. Cette masse apparente représente seulement 45% de la masse apparente adsorbée dans les conditions de l'expérience *A*, et 71% pour l'expérience *B*.

Discussion

Les expériences que nous venons de présenter indiquent que la masse apparente de fragments VE-EC1-4His adsorbés sur les lipides Ni-NTA-DOGS :DOPE (1 :7) varie selon la concentration initiale de la sous-phase en calcium et en fragment VE-EC1-4His, c'est-à-dire selon la proportion d'hexamères contenus dans la solution de cadhérines injectée. Le Tableau 16 rassemble les valeurs de masse apparente évaluées pour les trois expériences *A*, *B* et *C*.

	Concentration initiale en cadhérine	Pourcentage initial d'hexamères	Concentration en calcium	Masse (mg/m ²)	Variation relative à <i>A</i>	Variation relative à <i>B</i>
<i>A</i>	[VE-EC1-4His] = 22 μ M	95%	[Ca ²⁺] = 4 mM	9,4	-	-
<i>B</i>	[VE-EC1-4His] = 2,2 μ M	80%	[Ca ²⁺] = 0,5 mM	7,3	-22%	-
<i>C</i>	[VE-EC1-4His] = 0,22 μ M	20%	[Ca ²⁺] = 0,5 mM	5,2	-55%	-29%

Tableau 16 : Comparaison des masses apparentes adsorbées au mélange de lipides Ni-NTA-DOGS :DOPE (1 :7), en fonction de la concentration en calcium et de la concentration initiale de la solution de fragments de VE-cadhérine.

L'étude du fragment de C-cadhérine avait indiqué une différence de masse de 13% entre une couche du fragment C-EC1-5His élaborée sur une solution riche en calcium (5 mM CaCl₂) et une couche élaborée sur une solution pauvre en calcium (0,5 mM CaCl₂) (voir le Tableau 12). Ces deux monocouches ont été élaborées en présence de solutions contenant environ 50% de dimères et de monomères. En ce qui concerne l'adsorption du fragment VE-EC1-4His, la différence de masse apparente adsorbée est de 22% entre les expériences *A* et *B*. Cette différence de masse apparente adsorbée sur les lipides peut être interprétée à partir d'une adsorption mixte d'hexamères et de monomères du fragment VE-EC1-4His. En effet, comme nous l'avons remarqué dans le cas du fragment de C-cadhérine, lorsque les fragments de cadhérine n'interagissent pas (c'est-à-dire en l'absence de calcium), leurs extrémités sont libres et peuvent prendre des orientations variables [Pertz 1998]. Une monocouche constituée de fragments capables de s'auto-associer est donc plus dense qu'une monocouche au sein de laquelle les cadhérines n'interagissent pas. Ainsi, la monocouche de l'expérience *A*, formée à partir d'une proportion élevée d'hexamères (95%) et à forte concentration en ions calcium (4 mM), est plus dense que la monocouche de l'expérience *B*, élaborée à partir d'une proportion plus faible d'hexamères (80%) et dans une solution moins concentrée en ions calcium (0,5 mM).

Cette hypothèse est confirmée par l'expérience *C* au cours de laquelle une solution composée de 20% seulement d'hexamères de fragments VE-EC1-4His est injectée sous les lipides dans une sous-phase contenant 0,5 mM de calcium. Nous observons dans ce cas une couche très peu dense, puisque la masse apparente ne constitue que 45% de la masse de fragments ancrés aux lipides dans des conditions de concentration en calcium et en protéine favorables à la forme hexamérique des fragments de VE-cadhérine. La monocouche composée majoritairement

de la forme monomérique du fragment est moins dense que les monocouches composées d'hexamères.

Notons que la quantité de fragments injectée dans la sous-phase est largement supérieure à la quantité théorique nécessaire à la saturation complète d'une monocouche. En effet, les cadhérines ayant un diamètre de 4nm [Gulino1998] et la cuve expérimentale ayant un diamètre de 3 cm, la quantité de protéine nécessaire pour élaborer une monocouche dans laquelle les protéines seraient des cylindres côte à côte à la surface, est 24 fois moins élevée que la quantité de protéine injectée à une concentration finale de 0,5 μM , et 10 fois moins élevée dans le cas où la concentration finale est de 0,22 μM . La différence de masse adsorbée apparente observée dans les différents cas *A*, *B* et *C* ne peut donc pas être attribuée à un manque de protéines dans la sous-phase.

En conclusion, l'adsorption du fragment de VE-cadhérine VE-EC1-4His sur des lipides dépend de la composition en hexamère et en monomère de la sous-phase. Nous observons des couches moins denses lorsque la concentration en calcium de la sous-phase est égale à 0,5 mM (expérience *B*) et lorsque la forme monomérique du fragment est prépondérante (expérience *C*). Ces résultats sont cohérents avec ceux de P. Legrand *et al.* qui ont mis en évidence l'existence d'hexamères de VE-cadhérines dépendants du calcium.

Afin de déterminer si l'association des fragments de VE-cadhérine au sein du complexe hexamérique est parallèle ou antiparallèle, nous avons utilisé des monocouches de différentes densités massiques de surface. En effet, si les fragments associés à la monocouche lipidique constituent des hexamères antiparallèles, il devrait être possible de dissocier puis de ré-associer les fragments à la surface par modification de la concentration en calcium dans la sous-phase.

IV.3.2.2 Dissociation de fragments de VE-cadhérine

Nous avons montré que les fragments VE-EC1-4His liés à une monocouche de lipides forment des complexes dépendants de la concentration en calcium dans la sous-phase. Dans cette section, nous étudions d'abord la dissociation des complexes de fragment VE-EC1-4His en diluant progressivement la sous-phase de manière à l'appauvrir en calcium. Ensuite, nous étudions l'association entre des fragments de VE-cadhérine ancrés à la surface de monocouches lipidiques et d'autres fragments de VE-cadhérine injectés dans la sous-phase avec du calcium.

Considérons l'hypothèse des hexamères antiparallèles de VE-cadhérine et une monocouche formée par de tels complexes ancrés sous une monocouche de lipides. Une partie seulement des fragments serait alors liée aux lipides par l'intermédiaire de l'étiquette polyhistidine. L'autre partie des fragments présenterait le domaine EC4 comportant l'étiquette polyhistidine du côté opposé aux lipides. Pour accrocher un hexamère à la monocouche lipidique, il suffit en effet d'une seule molécule de fragment VE-EC1-4His. Ainsi, une partie des fragments est susceptible de se détacher si les interactions au sein des structures hexamériques sont supprimées.

Nous avons indiqué dans le chapitre II que dans une jonction entre deux cellules, les cadhérines ancrées dans la membrane cellulaire interagissent avec des cadhérines de la cellule opposée d'une manière dépendante du calcium [Takeichi 1991]. Une diminution de la concentration en calcium change les interactions entre cadhérines. O. Pertz *et al.* ont montré que les interactions entre cadhérines se faisaient par étape selon la concentration en calcium [Pertz 1998]. Plus précisément, une diminution de la concentration en calcium de la sous-phase engendre la disparition d'abord des interactions *trans*, puis des interactions *cis* et enfin elle peut conduire à la dénaturation des cadhérines. Nous nous proposons d'étudier la dissociation des structures hexamériques en fonction de la concentration en calcium, afin de confronter le comportement des fragments de VE-cadhérine à cette hypothèse.

Suite de l'expérience A

Protocole

Les fragments VE-EC1-4His ont été injectés à une concentration finale de 0,5 μM sous les lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7) dans une sous-phase contenant une concentration de 4 mM en ions Ca^{2+} . La concentration de la solution initiale de fragment était de 22 μM , ce qui correspond à une proportion d'hexamère est de 95%. Après stabilisation du signal ellipsométrique, la concentration de calcium est diminuée à 0,1 mM par dilution, c'est-à-dire par un échange de la sous-phase par une solution tampon identique à la précédente, sans protéine et contenant une concentration en ions Ca^{2+} de 0,1 mM. Au total, neuf dilutions à 50% ont été effectuées, correspondant à un volume échangé égal à environ 4 fois celui de la cuve, pour atteindre une concentration finale en calcium de 0,107 mM. Des solutions du chélatant d'ions divalents EGTA ont ensuite été ajoutées à la sous-phase, de manière à atteindre successivement les concentrations finales en EGTA de 0,5 mM, 0,67 mM, 2 mM et 10 mM.

La Figure 92 présente une série de courbes ellipsométriques angulaires mesurée sur cette couche de fragments de VE-cadhérine après stabilisation des signaux. A chaque étape, les variations des angles ψ et Δ en fonction de l'angle d'incidence ont été comparées à des courbes calculées. Les modèles utilisés pour le calcul de ces courbes ont servi à évaluer la quantité apparente de protéines ancrées en surface aux étapes successives :

- Première étape : Monocouche du fragment VE-EC1-4His ancrés aux lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7), dans une sous-phase contenant 4 mM de CaCl_2 , 3 heures 20 après l'injection des protéines;
- Deuxième étape : 22 heures après la diminution de la concentration en calcium à 0,1 mM;
- Troisième étape : 18 heures après l'addition d'EGTA à 2 mM;
- Quatrième étape : 20 heures après une seconde addition d'EGTA conduisant à une concentration finale de 10 mM.

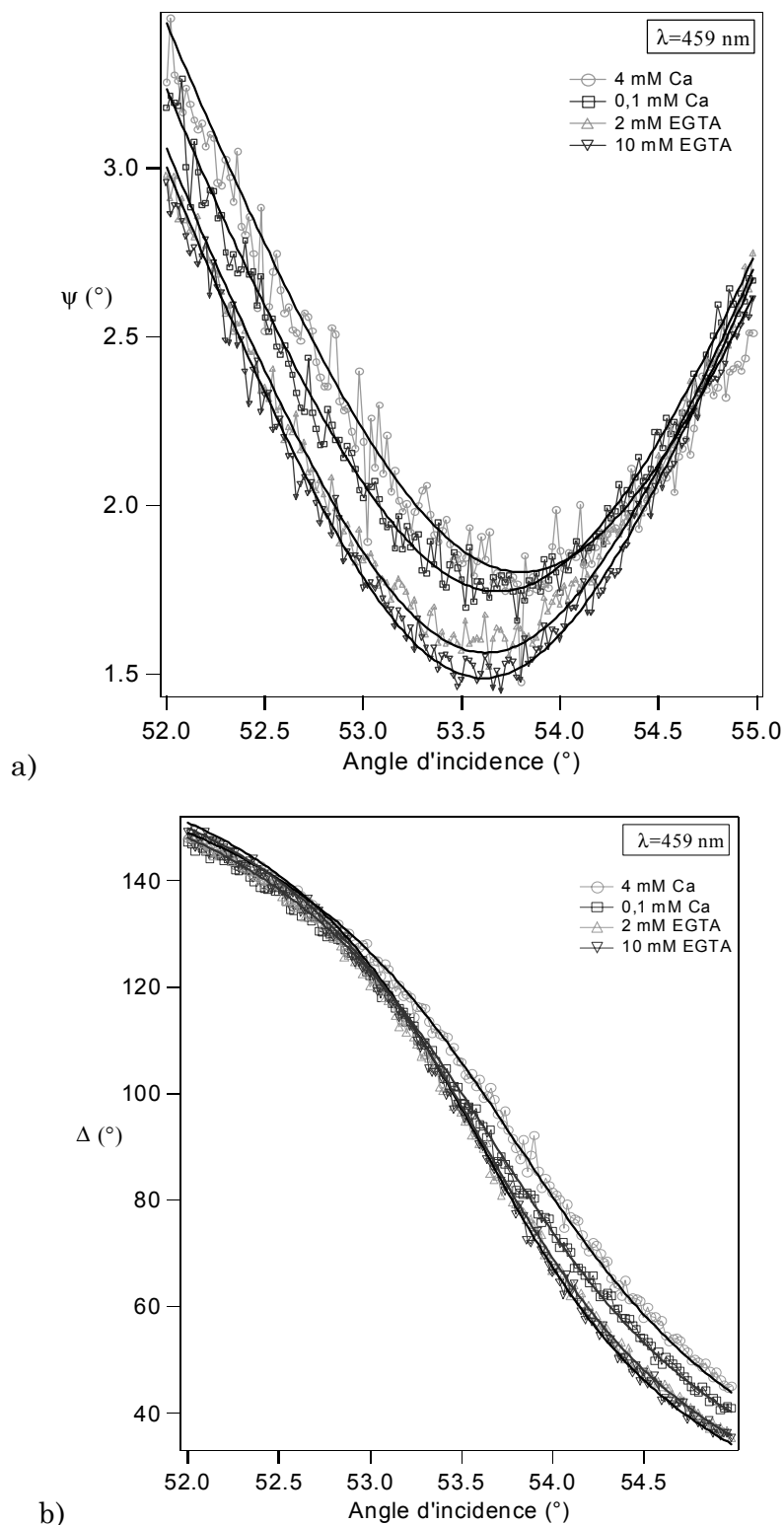


Figure 92 : *Expérience A* : Courbes ellipsométriques angulaires successives de ψ (a) et de Δ (b) et ajustements correspondant aux changements effectués dans la sous-phase : monocouche de fragments VE-EC1-4His ancrés aux lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7) avec une concentration initiale en calcium de 4 mM CaCl_2 , puis dilution de la sous-phase à 0,1 mM Ca, et injection d'EGTA pour atteindre les concentrations finales de 2 mM puis 10 mM. *Conditions Expérimentales* : [VE-EC1-4His] = 0,5 μM , $[\text{Ca}^{2+}] = 4 \text{ mM}$. [VE-EC1-4His] = 22 μM avant injection

Résultats de la mesure

Les variations de la masse adsorbée apparente en fonction du temps sont présentées sur la Figure 93. Les étapes principales de l'expérience sont indiquées par des flèches. La masse adsorbée apparente de la monocouche initiale de fragments de VE-cadhérine à 4 mM de calcium est de 9,4 mg/m². Cette valeur maximale constitue la référence pour les étapes suivantes de dissociation en fonction de la concentration en ions Ca²⁺. Après diminution de la concentration en calcium de la sous-phase à 0,1 mM CaCl₂ et 18 heures d'incubation, la quantité de protéines à la surface a diminué de 3%, à 9,1 mg/m². Puis, nous avons ajouté des solutions concentrées en agent chélatant EGTA permettant d'atteindre des concentrations finales de 0,5 mM, 0,67 mM, 2 mM et 10 mM en EGTA dans la sous-phase. La quantité de protéines adsorbées chute finalement à 7,8 mg/m² ce qui correspond à une diminution de 17% par rapport à la valeur initiale. Les valeurs des masses adsorbées apparentes évaluées sont reportées dans le Tableau 17.

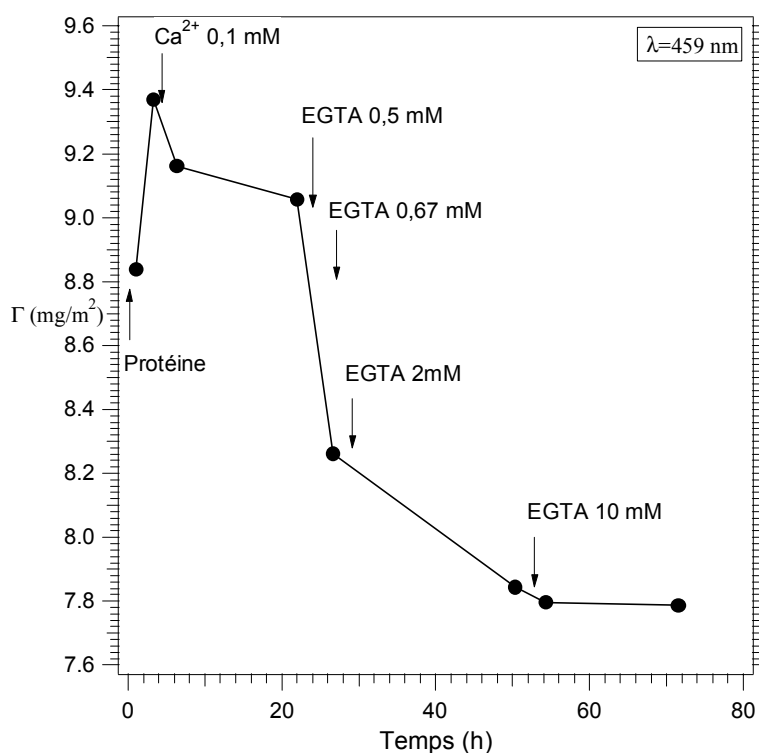


Figure 93 : *Expérience A* : Variation de la masse apparente de fragment VE-EC1-4His ancrés aux Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7) en fonction du temps et de l'appauvrissement de la sous-phase en calcium. Les flèches indiquent les injections de fragment VE-EC1-4His ou d'EGTA et le changement de la sous-phase pour atteindre la concentration en calcium de 0,1 mM. Conditions Expérimentales Initiales : [VE-EC1-4His] = 0,5 μM, [Ca²⁺] = 4 mM. [VE-EC1-4His] = 22 μM avant injection

Suite de l'expérience B

Protocole

Cette expérience a pour objectif d'étudier la dissociation des complexes anti-parallèles de fragments VE-EC1-4His formant une monocouche moins dense que celle de l'expérience A.

Une monocouche de fragments VE-EC1-4His a été élaborée en présence d'une solution composée de seulement 80% d'hexamères et contenant une concentration de 0,5 mM en ions Ca^{2+} . Les fragments VE-EC1-4His ont été injectés à une concentration finale de 0,5 μM sous les lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7). La concentration de la solution initiale de fragment était de 2,2 μM , ce qui correspond à une proportion d'hexamère est de 80 % (voir p. 134). Après stabilisation du signal ellipsométrique, la concentration de la sous-phase a été appauvrie en calcium par l'addition d'EGTA à une concentration finale de 3 mM, puis de 10 mM.

Résultats de la mesure

La Figure 94 présente les masses adsorbées apparentes calculées à partir de courbes ellipsométriques angulaires après stabilisation des angles ellipsométriques. La masse adsorbée apparente de fragments formant la monocouche initiale a été évaluée à partir des courbes ellipsométriques angulaires à 7,3 mg/m^2 .

Les injections successives d'EGTA produisent une première désorption de 20% de la masse adsorbée pour une concentration finale en EGTA de 3mM, la masse apparente étant égale à 6,1 mg/m^2 . Puis, une seconde désorption de 32% de la masse adsorbée est observée pour une concentration finale en EGTA de 10mM, la masse adsorbée apparente étant de 5,0 mg/m^2 .

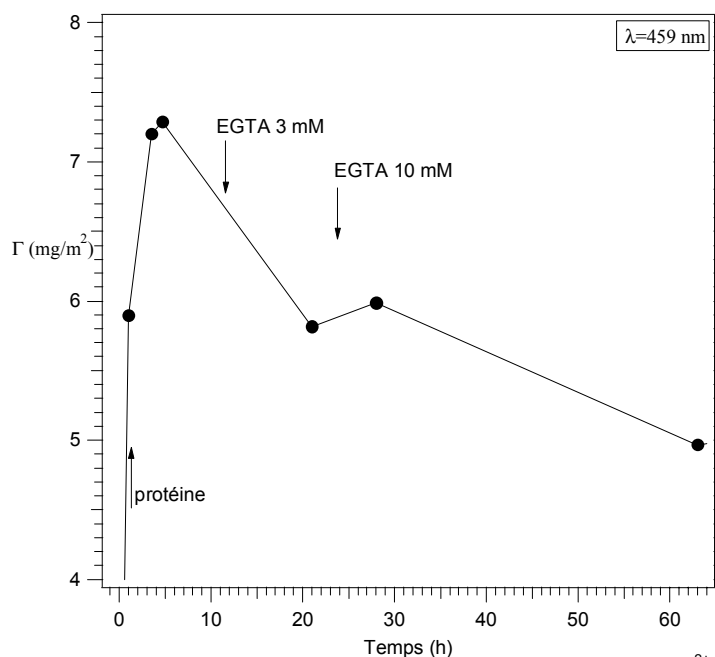


Figure 94 : *Expérience B* : Variations de la masse adsorbée apparente en fonction du temps pour une monocouche de fragments VE-EC1-4His ancrés aux lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7) et après injection d'EGTA à des concentrations finales de 3 mM et 10 mM. Conditions Expérimentales: $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,5 \mu\text{M}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 0,5 \text{ mM}$. $[\text{VE-EC1-4His}] = 2,2 \mu\text{M}$ avant injection.

Discussion et interprétations

Un décrochage de fragments VE-EC1-4His d'une monocouche ancrée à un mélange Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7), a été observée après appauvrissement de la concentration en Ca^{2+} dans la sous-phase. La diminution de la concentration en

Ca^{2+} a été tout d'abord réalisée par une dilution de la sous-phase, puis par addition d'EGTA. Le Tableau 17 rassemble les valeurs de la masse adsorbée apparente correspondant aux expériences décrites dans cette section.

La monocouche formée par des fragments VE-EC1-4His en proportion initiale de 95% d'hexamères en solution a perdu 3% de sa masse apparente initiale après la dilution de la concentration en calcium de la sous-phase de 4 mM à 0,1 mM, puis 17% de sa masse apparente après l'addition d'EGTA à une concentration finale de 10 mM. La masse adsorbée apparente de la monocouche laissée incuber pendant 20 heures à cette forte concentration en calcium n'a pas varié. Cela suggère qu'un équilibre entre la sous-phase et la monocouche a été atteint.

Si l'EGTA avait chélaté les ions Ni^{2+} des lipides et supprimé ainsi l'interaction entre lipide et protéine, on aurait pu s'attendre à une forte chute de la masse adsorbée apparente atteignant finalement la valeur de la monocouche de lipides seuls. Or, l'action de l'EGTA s'est limitée à la dissociation de 17% de fragments de la monocouche initiale. Par conséquent, il est possible que l'action de l'EGTA ait été faible sur les liaisons histidine-nickel. De plus, dans l'étude des fragments de C-cadhérine, nous avons vérifié que la désorption n'était pas exclusivement due à un décrochement des cadhérines des lipides ligands via la complexation de l'ion Ni^{2+} avec l'EGTA, mais aussi à une dissociation de complexes antiparallèles de fragment C-EC1-5His via la complexation de l'ion Ca^{2+} .

Considérons l'hypothèse d'hexamères antiparallèles ancrés aux lipides par l'intermédiaire de trois fragments. Dans ce cas, toute perte de masse de la monocouche attribuée à une dissociation de complexes antiparallèles impliquerait qu'une quantité de masse équivalente serait restée ancrée en surface. Cette proportion serait un minimum car il est possible que des fragments dissociés d'un hexamère *trans* se lient de nouveau avec les lipides et contribuent ainsi à une réaugmentation de la masse apparente. Ainsi, dans la cas où la perte de masse adsorbée apparente de 17% observée est interprétée comme une dissociation des fragments de VE-cadhérine, cette perte de masse correspondrait à une proportion minimale de 34% de la masse adsorbée apparente initiale impliquée dans des complexes antiparallèles. De la même manière, le pourcentage de fragment VE-EC1-4His ancrés aux lipides et engagés dans des complexes antiparallèles serait au minimum de 64% dans l'expérience B.

La monocouche formée en présence d'une solution contenant 80% d'hexamères (Expérience B) est moins dense que celle formée en présence d'une solution à 95% d'hexamères (Expérience A). Comme nous l'avons observé au cours de l'étude de la dissociation de fragment de C-cadhérine, l'effet de la dilution de la sous-phase sur la monocouche de fragments VE-EC1-4His est moindre que celui de l'EGTA. Cette observation est corrélée avec une plus grande désorption lors de l'ajout d'EGTA sous la monocouche de l'expérience B. Cela suggère que, lorsque la monocouche de fragment est moins dense, les sites de fixation du calcium et de nickel sont plus accessibles à l'EGTA. Par conséquent, la dissociation de complexes antiparallèles ancrés aux lipides pourrait être limitée par la densité de surface de la monocouche de fragments. Il semble donc impossible de dissocier la totalité des complexes antiparallèles sur des durées raisonnable. Trois hypo-

thèses peuvent expliquer ce phénomène : (1) une partie des fragments VE-EC1-4His seraient ancrés aux lipides sous forme hexamérique antiparallèles et des interactions parallèles entre hexamères entraîneraient une cohésion de la monocouche ce qui limiterait l'effet de l'EGTA; (2) à la surface de la monocouche lipidique, les fragments seraient majoritairement sous forme de complexes parallèles ou de monomères du fait des interactions entre l'étiquette polyhistidine et l'ion nickel des lipides; (3) après la dissociation de complexes antiparallèles en monomères due à l'action de l'EGTA, il se pourrait que des fragments se lient à nouveau aux lipides ligands. Ceci pourrait expliquer pourquoi la diminution de la masse adsorbée apparente n'est pas égale à la proportion initiale d'hexamères en solution.

<i>Expérience A : 95% d'hexamères en solution</i>			<i>Expérience B : 80% d'hexamères en solution</i>		
Etapes	Mass e (mg/m²)	%*	Etapes	Mass e (mg/m²)	%*
[Ca ²⁺] = 4 mM	9,4	-			
[Ca ²⁺] = 0,1 mM	9,1	-3%	[Ca ²⁺] = 0,5 mM	7,3	-
[EGTA] = 2 mM	8,3	- 12%	[EGTA] = 3 mM	6,1	-16%
[EGTA] = 10 mM	7,8	-17 %	[EGTA] = 10 mM	5,0	-32 %

Tableau 17 : Tableau comparatif des valeurs de masse adsorbée apparente lors de l'appauvrissement de la sous-phase en calcium. *Le pourcentage est calculé par rapport à la masse apparente de fragments adsorbés dans la monocouche initiale pour chaque expérience.

Pour vérifier que des complexes antiparallèles de VE-cadhérine peuvent se former à l'interface lipides-eau, nous avons injecté par la suite des fragments de VE-cadhérine à des monocouches lipidiques comportant à leur surface essentiellement des monomères de fragment VE-EC1-4His.

IV.3.2.3 Association de fragments

Nous avons vu que les fragments de VE-EC1-4His forment des complexes dépendants de la concentration en calcium dans la sous-phase. Dans cette section, nous étudions l'association entre des fragments de VE-cadhérine ancrés à la surface de monocouches lipidiques et d'autres fragments de VE-cadhérine injectés dans la sous-phase. L'objectif de cette expérience était d'étudier la formation de nouveaux complexes de fragments de VE-cadhérine à la surface des monocouches.

Après une dissociation d'hexamères

Protocole de l'expérience

Nous avons poursuivi l'expérience A présentée ci-dessus. La concentration initiale en calcium était de 0,5 mM, puis des complexes de VE-cadhérine ont été dissociés par additions successives d'EGTA. Les fragments VE-EC1-4His ont ensuite été injectés sous forme monomérique de manière à atteindre une concentration finale totale de 0,4 μM de fragment VE-EC1-4His. Dans le même temps, la concentration en ions Ca^{2+} a été augmentée à 4 mM. Les monomères de VE-EC1-4His ont été préparés comme décrit précédemment, c'est-à-dire en diluant une solution de fragment VE-EC1-4His à 0,22 μM dans une solution à 0,5 mM de calcium et laissant la solution incuber pendant 30 heures. Le suivi ellipsométrique de cette couche est représenté sur la Figure 95 par les variations de la masse adsorbée en fonction du temps.

Résultats de la mesure

Suite à l'ajout de calcium et de fragments de VE-cadhérine, une légère augmentation de 5% de la masse adsorbée est visible, conduisant à une masse adsorbée apparente de 5,2 mg/m^2 .

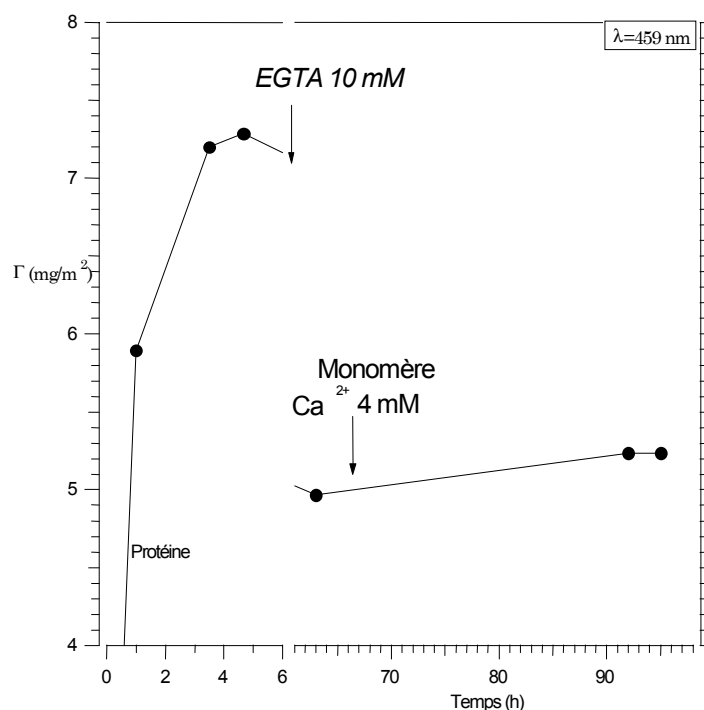


Figure 95 : *Expérience A* : Variations de la masse adsorbée apparente en fonction du temps pour une monocouche de fragments VE-EC1-4His ancrés aux lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7), après injection d'EGTA à des concentrations finales de 3 mM et 10 mM, et addition de monomères du fragment VE-EC1-4His et de 4 mM de CaCl_2 . Conditions Expérimentales: $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,5 \mu\text{M}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 0,5 \text{ mM}$. $[\text{VE-EC1-4His}] = 2,2 \mu\text{M}$ avant injection.

A partir d'une monocouche de monomères

Protocole de l'expérience

La monocouche de fragments VE-EC1-4His considérée dans cette section est celle présentée dans l'expérience C. Des fragments de VE-cadhérines ont été préparés afin de disposer d'une solution composée à 20 % seulement d'hexamères, comme décrit précédemment. Après la stabilisation des angles ψ et Δ , la sous-phase est rincée et remplacée par une solution tampon identique à la solution initiale et contenant une concentration en ions Ca^{2+} de 4 mM et une concentration en monomères de VE-EC1-4His de 0,275 μM . Enfin, pour déterminer si les monomères de VE-EC1-4His se sont ancrés à d'autres fragments VE-EC1-4His ou aux lipides, nous avons injecté de l'EGTA de manière à atteindre une concentration finale de 10 mM. La Figure 96 présente le suivi de la masse adsorbée apparente en fonction du temps.

Résultats

La masse adsorbée apparente mesurée 24 heures après l'addition des monomères de VE-EC1-4His et du calcium est de 8,7 mg/m^2 , soit 65% de plus que la masse adsorbée apparente de la monocouche à l'état initial qui était de 5,15 mg/m^2 . Après l'ajout d'EGTA, la masse adsorbée apparente chute de 16 %, pour atteindre une valeur à l'état final de 7,11 mg/m^2 .

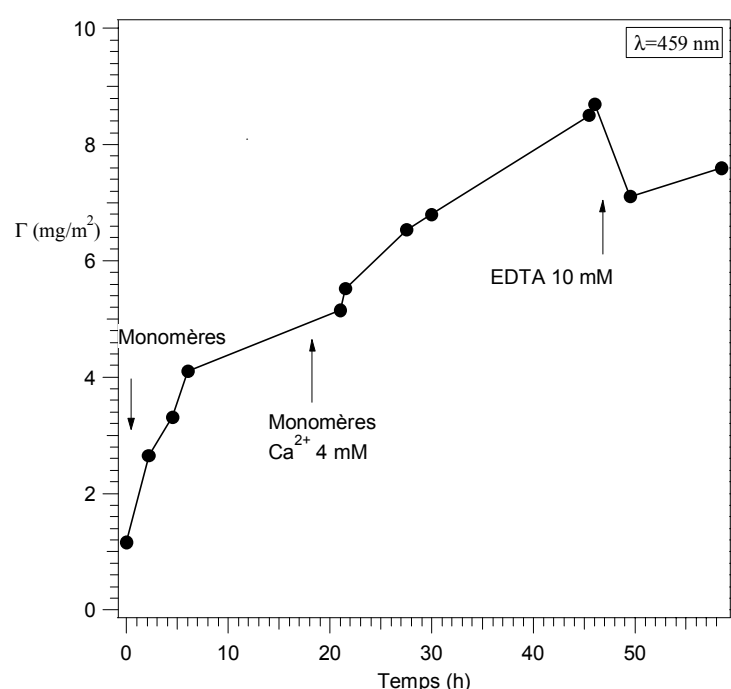


Figure 96 : *Expérience C* : Evolution de la masse adsorbée apparente en fonction du temps pour une monocouche de fragments VE-EC1-4His ancrés aux lipides Ni-NTA-DOGS:DOPE (1:7) et après ajout de fragments VE-EC1-4His frais et de CaCl_2 conduisant à une concentration finale en calcium de 4 mM, puis appauvrissement de la sous-phase en calcium par addition d'EGTA. $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,5 \mu\text{M}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 0,5 \text{ mM}$. $[\text{VE-EC1-4His}] = 0,22 \mu\text{M}$ avant injection.

Discussion et hypothèses d'interprétation

Le Tableau 18 rassemble les résultats concernant l'étude de l'auto-association des fragments VE-EC1-4His. Dans l'expérience A, une très faible quantité de monomères, injectés après l'ajout de l'EGTA, s'adsorbent à la monocouche. Cette observation paraît peu compatible avec une auto-association des fragments de VE-cadhérine en surface. Nous nous attendions à retrouver la quantité de matière adsorbée au départ, c'est-à-dire 7,3 mg/m². Il se peut qu'après l'addition d'EGTA et la perte de masse consécutive à cet ajout, les fragments VE-EC1-4His se soient réarrangés en surface, n'offrant plus de place pour interagir avec de nouvelles cadhérines. De plus, l'addition d'EGTA peut avoir un effet néfaste sur les fragments de VE-cadhérine. Les fragments de VE-cadhérine incubés sans calcium pendant une longue période pourraient en effet se dénaturer. Enfin, les fragments injectés possèdent aussi une étiquette histidine, donc la légère prise de masse peut être attribuée à des cadhérines se liant à des lipides ligands.

Expérience B :80% d'hexamères			Expérience C :20% d'hexamères		
Etapes	Masse (mg/m ²)	%*	Etapes	Masse (mg/m ²)	%*
[Ca ²⁺] = 0,5 mM	7,3	-	[Ca ²⁺] = 0,5 mM	5,2	
[EGTA] = 3 mM	6,1	-16%	[Monomères] = 0,275 µM [Ca ²⁺] = 4 mM	8,5	+65%
[EGTA] = 10 mM	5,0	-32 %	[EGTA] = 10 mM	7,1	+38%
[Monomères] = 0,4 µM [Ca ²⁺] = 4 mM	5,2	-29%			

Tableau 18 : Tableau comparatif des valeurs de masse adsorbée apparente lors de l'appauvrissement de la sous-phase en calcium puis de l'injection de fragments VE-EC1-4His supplémentaires et de calcium. *Le pourcentage est calculé par rapport à la masse apparente de fragments adsorbés dans la monocouche initiale pour chaque expérience.

L'ajout de monomères sous la monocouche de fragments VE-EC1-4His entraîne une augmentation de masse importante, puisque la masse adsorbée apparente double (expérience C). Des monomères se sont donc fixés à la monocouche, *a priori* soit par fixation à un lipide, soit par interaction avec un monomère constituant la monocouche initiale. L'effet de l'EGTA sur la monocouche induit alors une chute de masse de 16 % de la masse adsorbée apparente. Ainsi, une partie seulement des fragments se détachent de la monocouche, soit par rupture de l'interaction histidine-nickel de la liaison entre lipide et protéine, soit par dissociation de complexes de fragments nouvellement formés.

Deux raisons peuvent être avancées pour interpréter ce phénomène. D'abord, les monocouches formées d'hexamères sont denses et que probablement les sites de fixation des ions calcium sont peu accessibles. Ainsi, puisque la monocouche formée après la seconde injection de monomères et de calcium est dense, il est possible que l'action de l'EGTA ne puisse pas être efficace pour dissocier les complexes. Il est également possible que des fragments injectés dans le deuxième

temps interagissent avec les lipides par leur étiquette histidine. Cela expliquerait pourquoi la désorption consécutive à l'ajout d'EGTA n'est que de 16% alors que la prise de masse consécutive à l'ajout de fragments et de calcium était de 65 %. Nous avons remarqué, lors de l'étude du fragment de C-cadhérine, que l'agent chélatant EGTA dissociait peu les complexes lipide-protéine. Il n'est néanmoins pas possible ici d'exclure complètement cette hypothèse. Prises séparément, les deux expériences présentées dans cette section ne permettent pas de conclure de manière non ambiguë sur le mode d'interaction *cis* ou *trans* des fragments de VE-cadhérine.

IV.3.2.4 Conclusions sur l'auto-assemblage de fragments VE-EC1-4His

Nous avons réalisé des expériences de dissociation et d'association de complexes de fragments de VE-cadhérine ancrés à une monocouche lipidique par ajout d'EGTA puis de fragments supplémentaires. La comparaison des masses adsorbées apparentes conduit à la conclusion que les fragments sont sensibles à la concentration de la sous-phase en calcium et qu'un appauvrissement de la sous-phase en calcium induit une légère désorption qui pourrait être attribuée à une dissociation de complexes antiparallèles de fragments VE-EC1-4His.

Cependant, l'adsorption de monomères de fragment VE-EC1-4His consécutive à une dissociation de complexes par EGTA n'a pas été observée (expérience A), ce qui suggère soit une dénaturation des fragments ancrés aux lipides, soit un réarrangement au sein de la monocouche qui empêcherait les interactions entre fragments. En revanche, l'addition de monomères de fragment VE-EC1-4His sous une monocouche préformée de monomères de la même espèce conduit à un doublement de la masse adsorbée apparente (expérience C), qui suggère soit une association des fragments en complexes à la surface lipidiques, soit une liaison des fragments aux lipides par interaction entre l'étiquette polyhistidine des fragments et l'ion nickel des lipides. La diminution de la masse apparente adsorbée par addition successive d'EGTA à cette monocouche montre qu'une partie au moins des monomères de VE-EC1-4His supplémentaires injectés dans la sous-phase interagit avec la monocouche de monomères préformée. Pour s'affranchir des liaisons entre fragment et lipide, il serait nécessaire d'utiliser une construction composée du fragment VE-EC1-4 sans étiquette polyhistidine.

En conclusion, ces expériences apportent quelques éléments de preuve que les fragments VE-EC1-4His ancrés à une monocouche de lipides forment des complexes en surface dont une partie est antiparallèle et dont la formation est dépendante de la concentration environnante en calcium. Des expériences supplémentaires mettant en jeu des fragments sans étiquette histidine pourraient lever l'incertitude des expériences d'association B et C. Enfin, il n'est pas possible de se prononcer sur l'état oligomérique des complexes de fragment VE-EC1-4His, c'est-à-dire s'ils sont dimériques ou hexamériques par la méthode d'investigation qu'est l'ellipsométrie.

IV.3.3 Etude structurale d'interactions entre fragments de VE-cadhérine par réflectivité X

Cette section concerne l'étude de monocouches de fragments de VE-EC1-4His perpendiculaire à la surface par réflectivité des rayons X. Cette technique expérimentale permet de déterminer un profil de densité électronique de la monocouche le long d'un axe perpendiculaire à la surface. Un des objectifs de cette étude est de déduire la longueur du fragment fixé à la monocouche, afin de discuter les modèles d'hexamères proposés actuellement (voir le chapitre II). Nous nous proposons d'identifier les interactions entre les modules extracellulaires de VE-cadhérine par comparaison de la structure d'une monocouche du fragment VE-EC1-4His aux structures des monocouches formées avec différents fragments courts.

Cette étude de réflectivité X a été effectuée à l'ESRF sur la ligne de lumière Troïka 2 (ID 10 B). Parce que nous avons quelques craintes quant à la stabilité des lipides insaturés (comme Ni-NTA-DOGS et DOPC) sous le faisceau synchrotron, nous avons utilisé les lipides ligands à chaîne carbonée saturée Ni-NTA-DLGE pour toutes les monocouches, c'est-à-dire des lipides identiques à ceux utilisés pour l'étude de la C-cadhérine et malheureusement différents de ceux employés lors des études ellipsométriques.

IV.3.3.1 Fragments VE-EC1-4His

Protocole de l'expérience

Une solution de fragments VE-EC1-4His a été injectée sous une monocouche de lipides Ni-NTA-DLGE. La sous-phase contenait une concentration en ions Ca^{2+} de 5 mM. La concentration en fragment VE-EC1-4His de la solution initiale était de 3,9 μM , ce qui signifie qu'environ 85% des fragments se trouvaient sous forme hexamérique. La concentration finale en fragment dans la sous-phase était de 0,5 μM . Une mesure de réflectivité X a été effectuée 4 heures 30 après l'injection des fragments sous la monocouche. La courbe de réflectivité est présentée sur la Figure 97, accompagnée d'un ajustement fait par le programme *RefX*.

Résultats de la mesure

Une courbe de réflectivité a été mesurée sur une couche de lipides Ni-NTA-DLGE seuls lors de la même série d'expériences à l'ESRF. L'ajustement indique une épaisseur totale de 2,6 nm (voir Figure 41, couche C). Sur la courbe de réflectivité mesurée sur la monocouche contenant le fragment VE-EC1-4His, des interférences de courte période apparaissent. Elles signalent la présence d'une couche attenante aux lipides correspondant aux protéines.

Le profil de densité électronique ayant servi de modèle à l'ajustement est présenté sur la Figure 98. La longueur totale de la couche lipides+protéines est de 25 nm avec cependant une nette diminution de densité électronique à partir d'une profondeur de 22 nm.

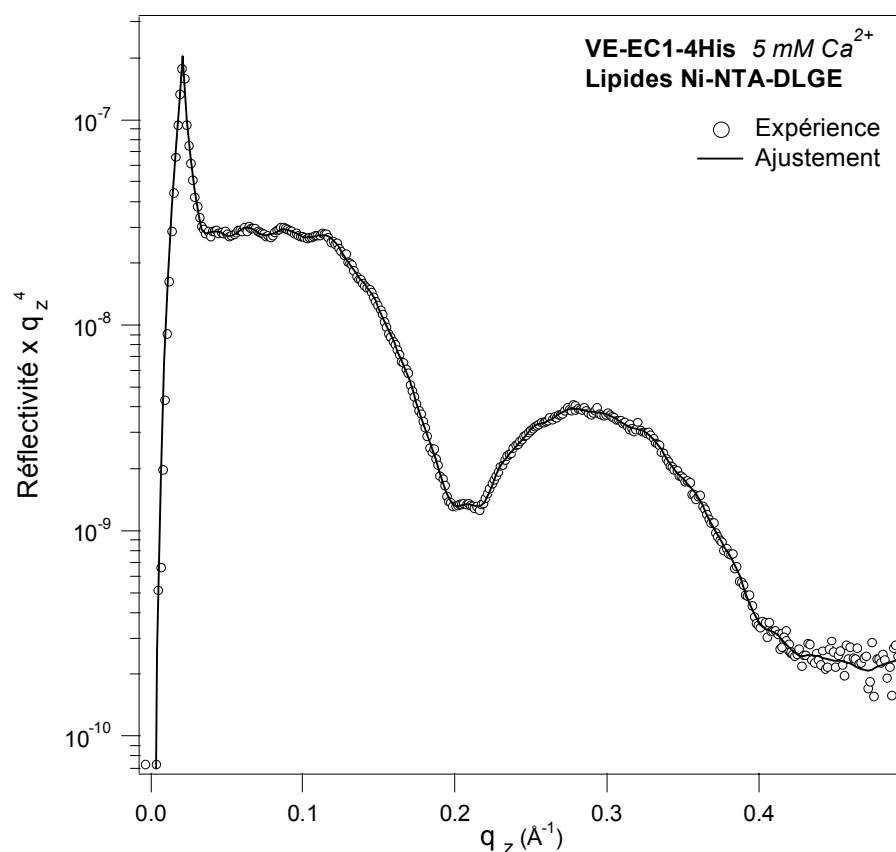


Figure 97 : Courbes de réflectivité mesurée sur une monocouche de fragment VE-EC1-4His ancré aux lipides Ni-NTA-DLGE et ajustement. Conditions Expérimentales: [VE-EC1-4His] = 0,5 μM , [Ca^{2+}] = 5 mM.

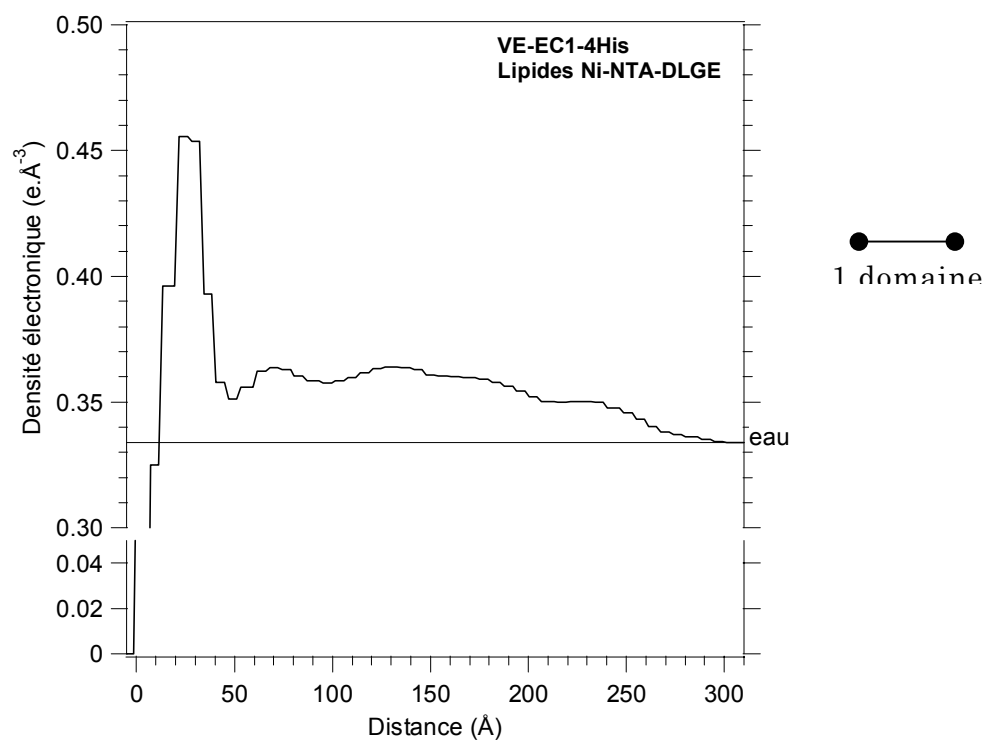


Figure 98 : Profil de densité électronique de la monocouche de fragments VE-EC1-4His ayant permis de calculer l'ajustement correspondant (Figure 97). Conditions Expérimentales: [VE-EC1-4His] = 0,5 μM , [Ca^{2+}] = 5 mM, lipides Ni-NTA-DLGE.

Il est difficile de déterminer précisément la longueur de la protéine elle-même à cause de la rugosité, attribuée à la fois à une distribution d'orientation des protéines et une inhomogénéité de la couche. La contribution des lipides s'élève à environ 4 nm. La couche de protéine mesure donc 21 nm d'épaisseur. Une modulation faisant apparaître quatre maxima de densité électronique est visible sur le profil de densité électronique au sein de la partie protéique attribuée aux cadhérines. Sa période est d'environ 5,6 nm.

Discussion : une monocouche constituée d'hexamères ?

D'après Legrand *et al.*, la longueur du fragment VE-EC1-4His de VE-cadhérine est évaluée à 18 nm, et l'assemblage en hexamère constitué de fragments décalés d'un domaine mesure 23,3 nm [Legrand 2001]. Il se pourrait donc que la monocouche étudiée soit formée, en partie au moins, d'hexamères plutôt que de monomères. La monocouche formée est légèrement plus mince que le complexe allongé de fragments VE-EC1-4His. Les fragments VE-EC1-4His composant la monocouche pourraient donc être légèrement inclinés en faisant un angle d'inclinaison moyen de 23° par rapport à la normale à la surface. Il se pourrait également qu'un mélange de fragments sous formes monomérique longue de 18 nm et hexamérique longue de 23 nm soient ancrés aux lipides. Dans ce cas, le profil de densité électronique déterminé serait le résultat de ces deux contributions. Cela pourrait expliquer la chute de densité électronique à partir d'une profondeur de 22 nm comptée depuis la surface libre des lipides.

Considérons l'hypothèse décrivant un hexamère de fragment VE-EC1-4His comme un alignement anti-parallèle des fragments. Un domaine extracellulaire de cadhérine mesure 4,5 nm (voir le Tableau 1 p.12). Ainsi, les sur-densités observées pourraient être la projection des domaines extracellulaires de la VE cadhérine le long de l'axe z . Le domaine EC4, qui possède l'étiquette histidine, pourrait représenter la première sur-densité près de la tête polaire des lipides. Puis, les domaines EC3, EC2 et EC1 seraient répartis dans la deuxième (5,8 nm) et la dernière sur-densité (5,5 nm) comme le montre la Figure 99 a). Sur cette figure, trois fragments de VE-cadhérine appartenant à l'hexamère sont liés aux lipides, les trois autres leur étant associés de manière antiparallèle. Les domaines EC4 liés aux lipides dépassent du complexe et les domaines EC2 se font face, ainsi que les domaines EC1 et EC3, comme l'ont décrit P. Legrand *et al.* [Legrand 2001]. Les domaines EC4 des fragments anti-parallèles non fixés aux lipides sont mobiles vers l'extérieur de la couche, ce qui pourrait expliquer une inhomogénéité de la monocouche et permettrait d'expliquer la chute lente de la densité électronique en fin de profil.

S. Bibert *et al.* ont récemment proposé un second modèle d'hexamères dans lequel les fragments VE-EC1-4His sont décalés différemment, comme l'indique la Figure 99 b). Dans ce complexe, les domaines EC3 se font face et les domaines EC2 et EC4 interagissent. Les domaines EC1 sont décalés et libres aux extrémités de l'hexamères. Les auteurs postulent que le domaine EC5 interagirait avec le domaine EC1 dans un complexe formé de fragments extracellulaires entiers (voir aussi la Figure 8, p. 14). Cet arrangement permet de rendre compte des interactions homotypiques observées entre fragments courts de VE-cadhérine de

différentes compositions [Bibert 2002]. Seuls les fragments VE-EC1-4 et VE-EC1-5 forment en effet des hexamères. Le domaine EC4 paraît donc important puisque les fragments VE-EC3-4 et VE-EC2-4 forment des dimères, alors que les fragments VE-EC1-3, VE-EC1-2 ainsi que les domaines extracellulaires EC1 et EC4 restent sous forme monomérique. Les auteurs suggèrent donc que le domaine EC4 soit intégré au complexe.

Nos résultats ne nous permettent pas de trancher entre ces deux modèles. Cependant, le premier modèle paraît plus vraisemblable puisque l'étiquette polyhistidine fixée sur le domaine EC4 semble peu accessible au lipide ligand dans le second modèle.

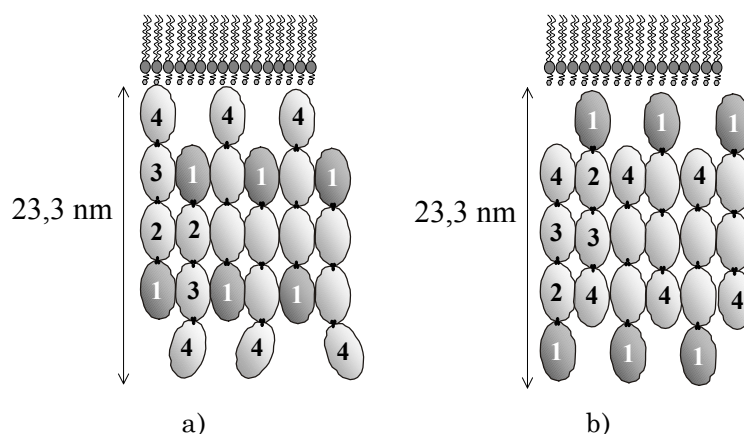


Figure 99 : Deux représentations hypothétiques d'un hexamère de fragments VE-EC1-4His "mis à plat" et ancrés à des lipides ligands. a) modèle proposé par P. Legrand *et al.* [Legrand 2001], b) modèle proposé par S. Bibert *et al.* [Bibert 2002].

Dans l'étude des fragments de C-cadhérine, nous n'avons pas observé de surdensité représentant de manière nette les domaines extracellulaires. Le fait que des modulations de densité électronique soient visibles sur le profil de densité électronique de la monocouche de fragment VE-EC1-4His indique que cette monocouche est mieux ordonnée que celle des fragments C-EC1-5His. Si les fragments VE-EC1-4His sont ancrés aux lipides sous forme d'hexamères antiparallèles, il est probable qu'ils seraient liés en trois points à des lipides ligands. Dans une telle configuration, on conçoit que les fragments soient perpendiculaires à la surface, ce qui faciliterait leur arrangement ordonné.

IV.3.3.2 Interactions entre fragments de VE-cadhérine

L'objectif de cette étude était de localiser les domaines impliqués dans les interactions homotypiques entre fragments de VE-cadhérine. Dans ce but, nous avons étudié les interactions entre le fragment VE-EC1-4His et des fragments plus courts, c'est-à-dire comportant deux ou trois des modules extracellulaires de VE-cadhérine. Pour cela, nous avons cherché à obtenir des monocouches formées par des complexes mixtes constitués d'un fragment court et du fragment VE-EC1-4His. Puis, afin de déterminer si les fragments ont interagi et de localiser l'interaction, nous avons comparé les profils de densité électronique obtenus par réflectivité X sur les monocouches hétérogènes aux profils de densité électronique de la monocouche formée uniquement du fragment VE-EC1-4His seul. Ces

mesures devraient nous permettre de déterminer la nature des modules impliqués dans la formation de l'hexamère de VE-cadhérine.

Nous avons aussi effectué un essai non concluant avec des fragments courts de C-cadhérine injectés sous une monocouche formée par le fragment C-EC1-5His (voir IV.2.4.2, p.122). Deux raisons principales peuvent expliquer cet échec. Premièrement, les interactions entre fragments différents sont moins fortes que celles qui existent entre fragments identiques. Il est donc nécessaire d'utiliser un large excès de fragments courts pour forcer l'équilibre vers la formation de complexes mixtes. Deuxièmement, les monocouches de cadhérines que nous avons élaborées étaient assez denses et il est possible que le fragment court n'ait pas pu s'insérer facilement au milieu des cadhérines déjà ancrées aux lipides.

Par conséquent, il nous a semblé approprié de mélanger des fragments VE-EC1-4His avec des fragments courts préalablement au greffage des fragments sur la monocouche lipidique, et d'injecter ce mélange pour ancrer le complexe protéique aux lipides. De plus, afin de s'assurer que seuls les fragments VE-EC1-4His se lient aux lipides, les fragments courts ont été produits sans étiquette histidine. Trois fragments de VE-cadhérine ont été utilisés dans ce type d'expérience : les fragments VE-EC3-4, VE-EC2-4 et VE-EC1-3. Les interactions régies par ces fragments courts ont été présentées dans le chapitre II (Figure 7, p.13). Les fragments VE-EC3-4 s'auto-associent sous forme de dimères, ainsi que les fragments VE-EC2-4, et les fragments VE-EC1-3 restent sous forme monomérique.

Mélange de fragments en solution

Les fragments de VE-cadhérine ont été mélangés avant leur repliement en utilisant un rapport molaire (fragment court)/(fragment VE-EC1-4His) de 100 afin de favoriser les interactions mixtes. Un temps d'incubation de 24 heures à température ambiante est nécessaire pour dissocier les hexamères du fragment VE-EC1-4His de VE-cadhérine, et l'association est également très lente. Le mélange a donc été laissé 48 heures à température ambiante avant d'être injecté dans la sous-phase.

Fragments VE-EC3-4 et VE-EC2-4

Les mesures de réflectivité ont été effectuées sur des monocouches de lipides après l'injection des mélanges de fragments VE-EC1-4His + VE-EC3-4 et VE-EC1-4His + VE-EC2-4. Elles sont très proches de la courbe de lipides Ni-NTA-DLGE seuls comme l'indiquent les Figure 100 et Figure 102. Une petite différence dans la position et l'amplitude du minimum des lipides est observée. Ces courbes ont été ajustées avec un modèle à trois boîtes par le programme Parratt32 et les profils de densité électronique correspondant sont présentés sur la Figure 101 et la Figure 103.

Dans les deux cas, la partie représentant la tête polaire des lipides est plus large et un peu plus dense dans le profil de densité électronique correspondant à la monocouche avec fragments que dans le profil de densité électronique de la monocouche de lipides seuls. Cette différence est cependant moins importante

que celle observée dans le cas de l'adsorption non-spécifique (voir Figure 83). Les protéines ont très faiblement modifié la structure de la monocouche de lipides. Il est possible que les protéines présentent des inclinaisons diverses produisant une couche inhomogène, peu dense et très fine. Celle-ci se traduirait sur le profil par une légère sur-densité près de la tête polaire des lipides. Néanmoins, ces résultats montrent que le mélange de fragments ne forme pas une monocouche orientée sous les lipides.

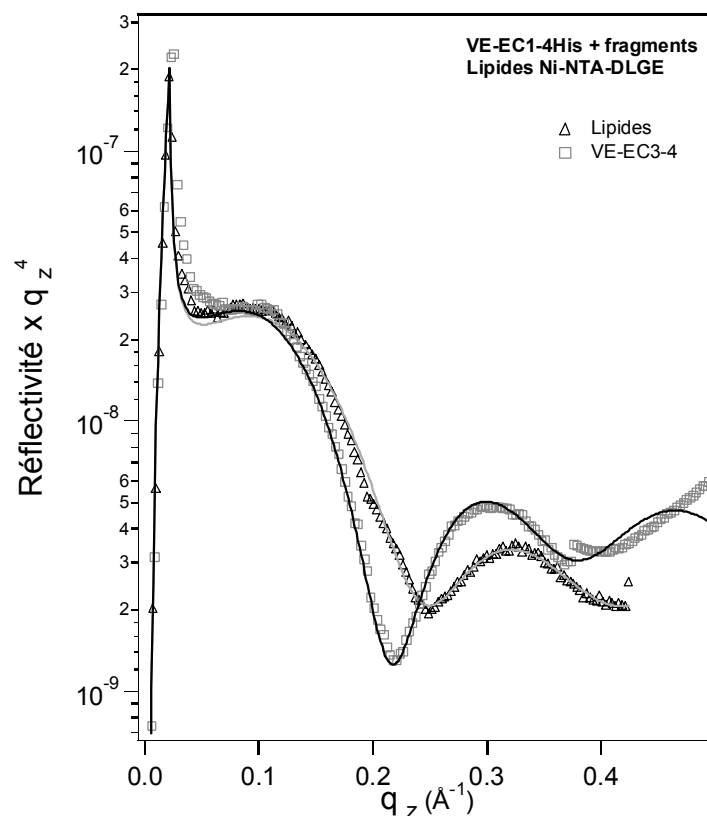


Figure 100 : Courbe de réflectivité lipides Ni-NTA-DLGE seuls et avec le mélange VE-EC1-4His + VE-EC3-4. Conditions Expérimentales: [VE-EC1-4His] = 0,5 μ M,, [Ca²⁺]= 5 mM.

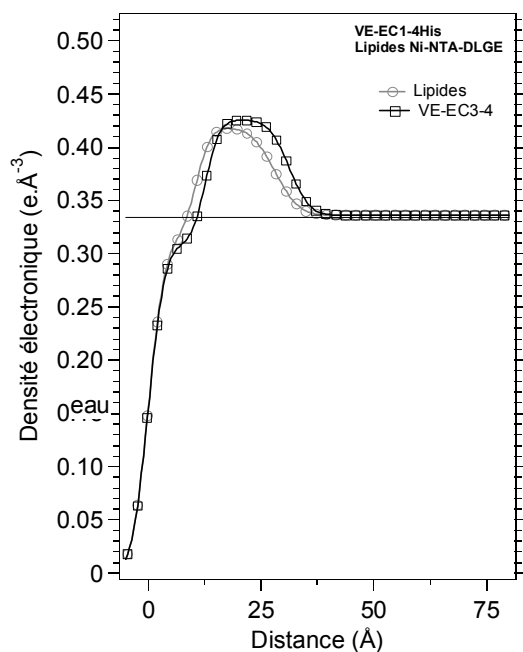


Figure 101 : Comparaison des profils de densité électronique calculés pour les couches de lipide Ni-NTA-DLGE seul et avec le mélange VE-EC1-4His + VE-EC3-4

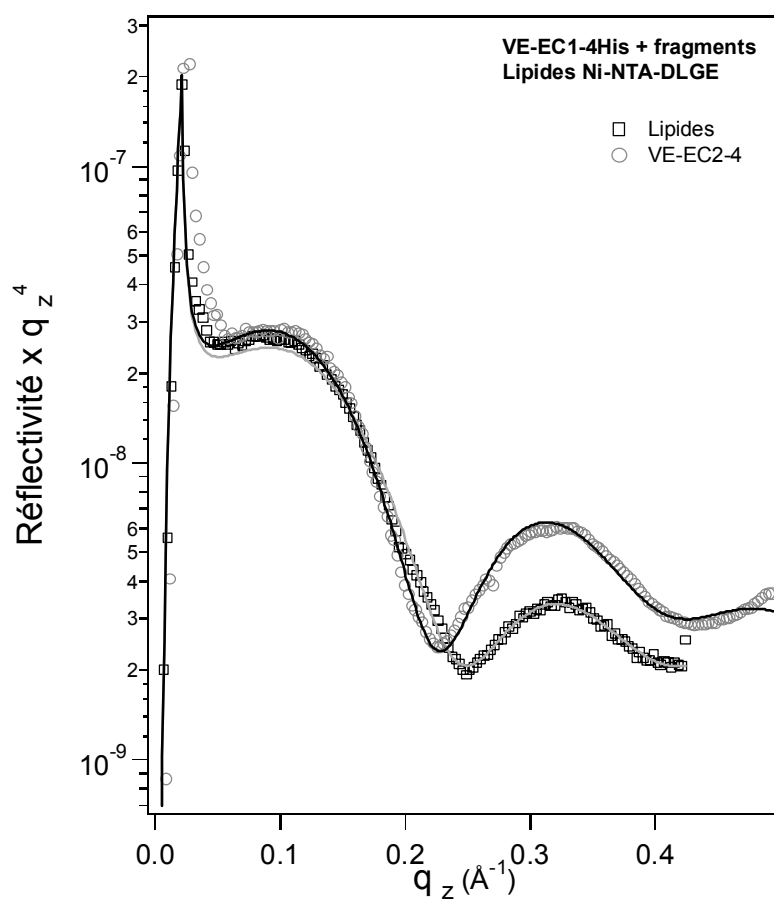


Figure 102 : Courbe de réflectivité lipides Ni-NTA-DLGE seuls et avec le mélange VE-EC1-4His + VE-EC2-4. Conditions Expérimentales: [VE-EC1-4His] = 0,5 µM, [Ca²⁺] = 5 mM.

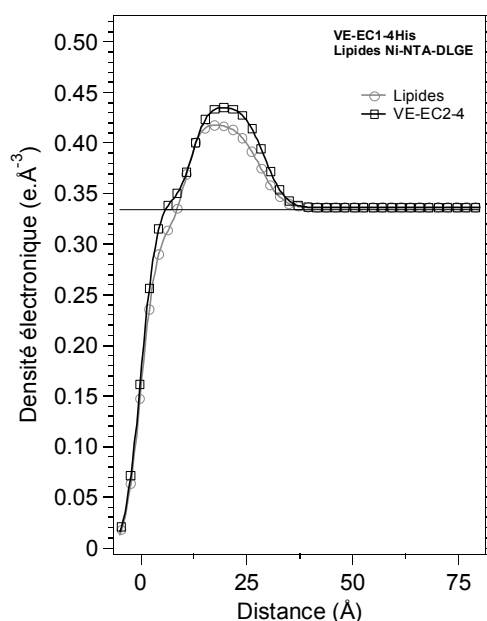


Figure 103 : Comparaison des profils de densité électronique pour calculées les couches de lipide Ni-NTA-DLGE seul et avec le mélange VE-EC1-4His + VE-EC2-4

	Ni-NTA-DLGE #C	Fragment VE- EC3-4	Fragment VE- EC2-4
Couche 1			
d (Å)	10,6	12,7	12,1
ρ (e.Å ⁻³)	0,321	0,308	0,341
σ (Å)	2,90	2,90	2,96
Couche 2			
d (Å)	17,5	18,6	17,0
ρ (e.Å ⁻³)	0,418	0,425	0,436
σ (Å)	2,56	2,50	2,80
Substrat			
ρ (e.Å ⁻³)	0,336	0,336	0,336
σ (Å)	4,17	3,53	3,86
Total			
d (Å)	28,1	31,32	29,1

Tableau 19 : Modèles utilisés par les ajustements des courbes de lipides Ni-NTA-DLGE seuls et après l'injection des mélanges de fragment VE-EC1-4His + VE-EC3-4 et VE-EC1-4His + VE-EC2-4. d : épaisseur, ρ : densité électronique, σ : rugosité.

Fragment VE-EC1-3

La courbe de réflectivité mesurée sur la couche où le mélange des fragments VE-EC1-4His et VE-EC1-3 a été injecté présente des caractéristiques très similaires à celle mesurée sur la protéine VE-EC1-4His seule. En premier abord, nous pouvons donc affirmer que des fragments de VE-cadhérine se sont ancrés aux lipides, contrairement aux cas précédemment décrits. La question est de savoir si les fragments VE-EC1-4His se sont fixés seuls, le fragment court VE-

EC1-3 restant en solution, ou si le complexe VE-EC1-4His : VE-EC1-3 s'est ancré aux lipides.

Les courbes de réflectivité X mesurées sur une monocouche de fragment VE-EC1-4His (Figure 97) et sur le mélange VE-EC1-4His:VE-EC1-3 (Figure 104) sont très similaires. Les profils de densité électronique correspondant à ces mesures sont comparés sur la Figure 105. Le profil de la monocouche incubée avec le fragment VE-EC1-3 est constitué de quatre sur-densités comme celui de la monocouche de fragments VE-EC1-4His seuls. La monocouche incubée avec le fragment VE-EC1-3 paraît légèrement plus dense que celle correspondant au fragment VE-EC1-4His seul.

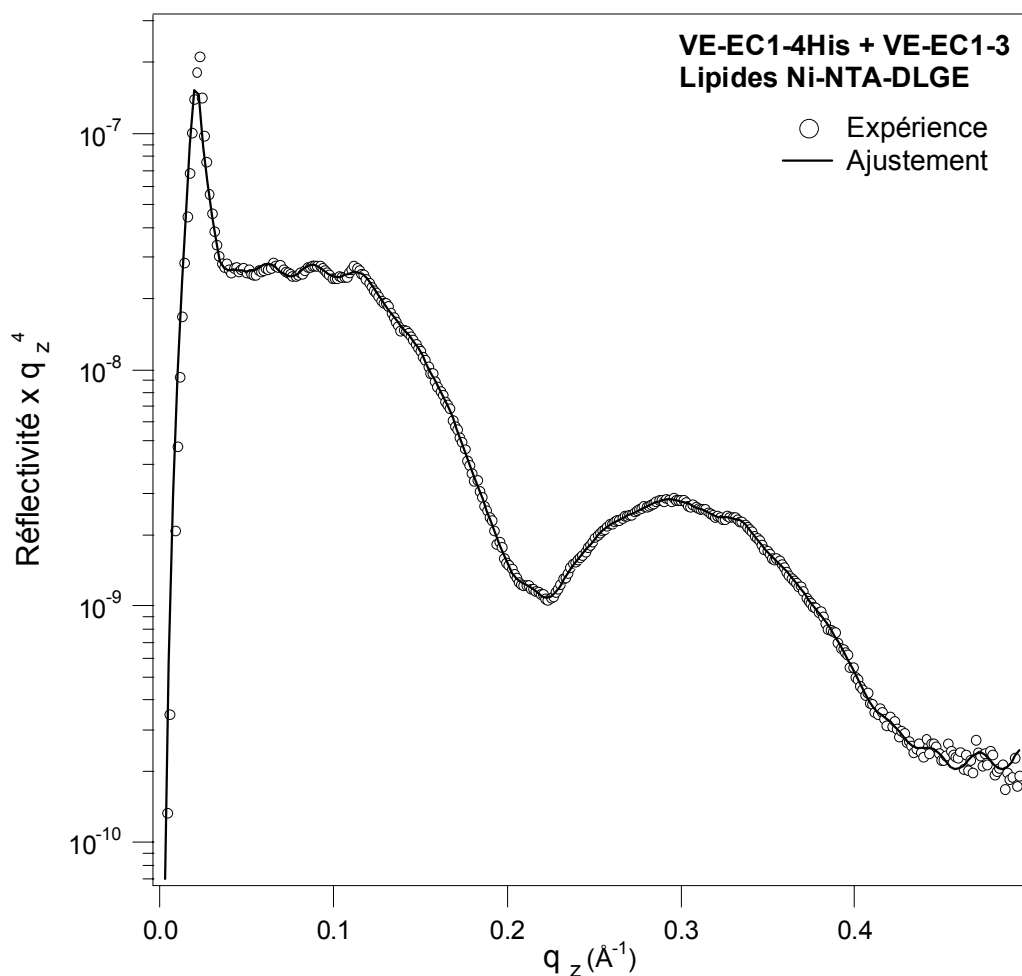


Figure 104 : Courbe de réflectivité mesurée sur une monocouche du mélange VE-EC1-4His + VE-EC1-3. Conditions Expérimentales: [VE-EC1-4His] = 0,5 μM , $[\text{Ca}^{2+}]$ = 5 mM, lipides Ni-NTA-DLGE

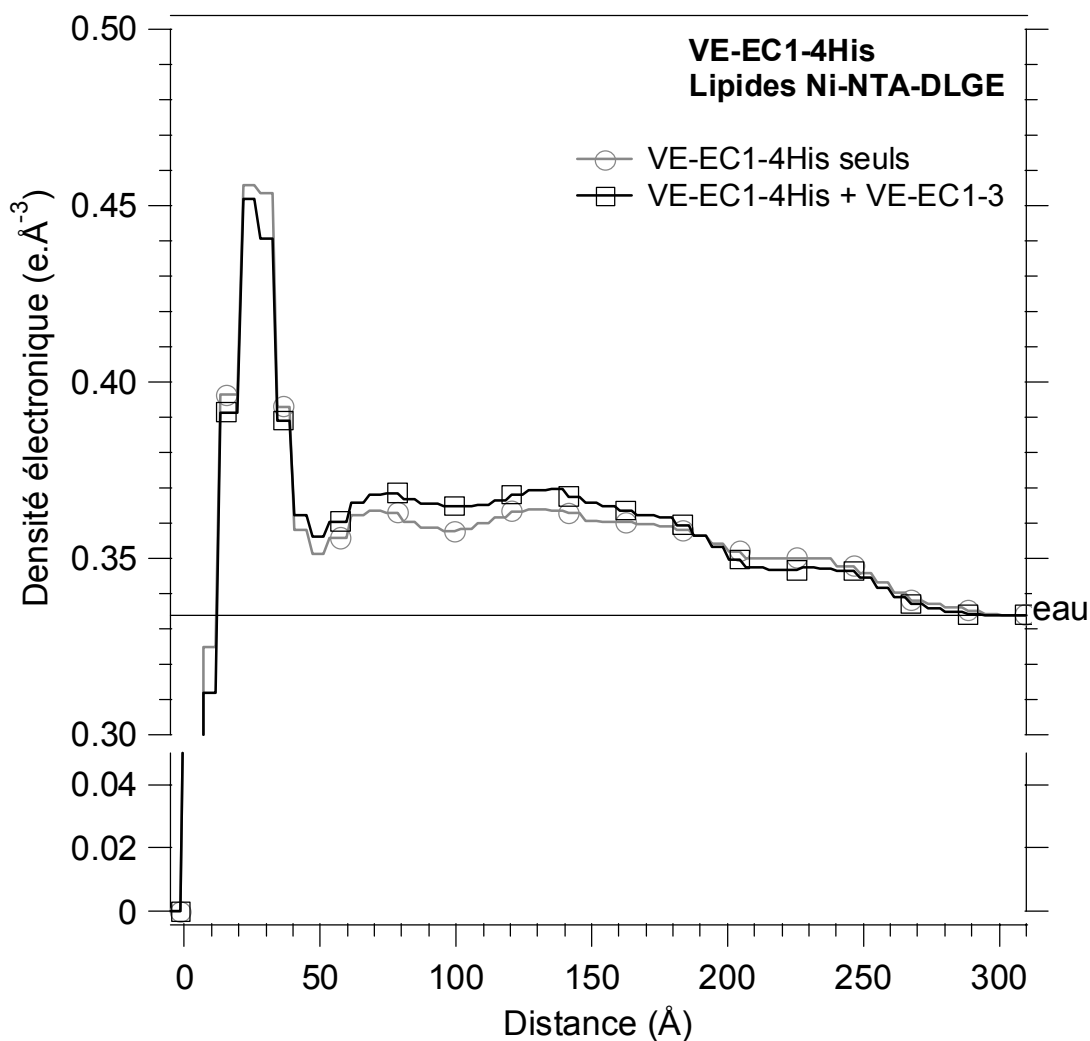


Figure 105 : Comparaison des profils de densité électronique calculés pour les monocouches formées de fragment VE-EC1-4His seuls et du mélange de fragment VE-EC1-4His + VE-EC1-3. Conditions Expérimentales: [VE-EC1-4His] = 0,5 μ M, $[Ca^{2+}]$ = 5 mM.

Discussion et conclusions

Les expériences de réflectivité X que nous avons présentées indiquent une différence de comportement entre d'une part les mélanges de fragments VE-EC3-4 ou VE-EC2-4 et VE-EC1-4His et d'autre part le mélange de fragments VE-EC1-3 et VE-EC1-4His.

La présence des fragments courts VE-EC2-4 et VE-EC3-4 semble avoir gêné l'adsorption du fragment VE-EC1-4His sur la monocouche de lipides. Pour expliquer cela, une hypothèse peut être avancée. Il se pourrait que la formation de complexes mixtes entre ces fragments rende inaccessible l'étiquette polyhistidine aux ions Ni^{2+} des lipides et soit ainsi à l'origine d'un blocage de la liaison lipide-protéine.

En revanche, une monocouche a pu être formée dans le cas du mélange de fragments VE-EC1-4His et VE-EC1-3. La constitution de cette monocouche peut être envisagée de plusieurs manières. (1) Les fragments n'interagiraient pas et seul le fragment VE-EC1-4His serait ancré aux lipides. Dans ce cas, il se pour-

rait qu'un mélange d'hexamères et de monomères soient ancrés aux lipides. La proportion de ces deux espèces dans la monocouche pourrait être différente dans les deux expériences et se traduire par une légère différence dans les profils de densité électronique. (2) La légère différence de densité observée entre les profils de densité électronique du fragment VE-EC1-4His seul et du mélange considéré, pourrait correspondre à l'ancrage de complexes mixtes. Dans ce cas, les positions relatives des fragments VE-EC1-3 et VE-EC1-4His dans le complexe laisserait l'étiquette polyhistidine du fragment VE-EC1-4His accessible pour l'ion Ni^{2+} des lipides. (3) Les fragments VE-EC1-4His et VE-EC1-3 auraient interagi de manière à ce que le domaine court bloque l'accès de l'étiquette polyhistidine à l'ion Ni^{2+} des lipides et donc seuls des fragments VE-EC1-4His se seraient ancrés aux lipides. Cependant, l'excès de fragment court VE-EC1-3 utilisé était dans un rapport 100 par rapport à la concentration du fragment VE-EC1-4His, ce qui semble contredire cette hypothèse.

Ces observations nous permettent de proposer un modèle d'interaction entre les fragments de VE-cadhérine considérés. Par construction, l'étiquette polyhistidine du fragment VE-EC1-4His est située en position C-terminale, sur le domaine EC4. Lorsque l'interaction histidine-nickel est perturbée, il est raisonnable de supposer que l'association des fragments implique le domaine EC4. Seul un auto-assemblage parallèle des fragments permettrait de réaliser une telle interaction. Dans ce modèle, les domaines extracellulaires de cadhérine sont alignés de manière à ce que deux domaines identiques soient face à face, comme le suggère la Figure 106. Ce modèle pourrait également rendre compte de l'expérience impliquant le fragment VE-EC1-3. En effet, l'absence du domaine EC4 dans ce fragment court empêcherait le blocage de l'étiquette histidine. La monocouche élaborée en présence du mélange VE-EC1-4His et VE-EC1-3 pourrait être formée de complexes mixtes VE-EC1-4His:VE-EC1-3. Ces interactions pourraient refléter les interactions *cis* entre hexamères ancrés à la surface de la cellule ou entre fragments monomériques de VE-cadhérine.

Cependant, les fragments VE-EC1-3 restent sous forme monomérique en solution, alors que les fragments VE-EC2-4 et VE-EC3-4 s'associent sous forme de dimères [Bibert 2002]. Le domaine EC4 semble donc jouer un rôle important dans les interactions entre les fragments de VE-cadhérine. Il est donc tout à fait possible que les fragments VE-EC1-3 n'aient pas interagi avec les fragments VE-EC1-4His. Le profil de densité électronique observé ne permet pas de trancher entre une monocouche de fragment VE-EC1-4His seuls et une monocouche mixte composée de fragments VE-EC1-4His et VE-EC1-3 associés.

En revanche, les modèles d'assemblage anti-parallèle (Figure 99 a) et b), p.153) ne permettraient pas de rendre compte d'un blocage de l'étiquette polyhistidine dans deux cas considérés, le mélange contenant le fragment VE-EC2-4 et le mélange contenant le fragment VE-EC3-4. En effet, dans ces modèles, le domaine EC4 resterait libre au moins dans le cas du mélange contenant le fragment VE-EC3-4.

En conclusion, un assemblage parallèle des fragments de VE-cadhérine pourrait expliquer les expériences mettant en jeu les fragments contenant le domaine EC4. Il n'est pas possible de conclure dans le cas du fragment VE-EC1-3.

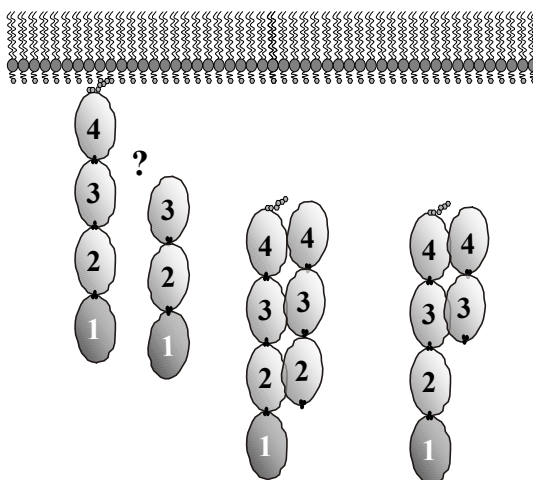


Figure 106 : Modèle d'interactions entre fragments de VE-cadhérine permettant d'interpréter les résultats obtenus par réflectivité des rayons X présentés dans cette étude.

Toutefois, d'après S. Bibert *et al.* [Bibert 2002], parmi les fragments que nous avons étudiés, seuls les fragments VE-EC2-4 et VE-EC3-4 présentent des propriétés adhérentes, vraisemblablement grâce à l'implication du domaine extracellulaire EC4. Ce domaine manque au fragment VE-EC1-3, ce qui l'empêche de former des complexes homotypiques. Il se pourrait donc qu'il n'interagisse pas avec le fragment VE-EC1-4His et que seuls ces derniers fragments se sont ancrés aux lipides. Ceci expliquerait que les profils de densité électronique de monocouches formées en présence de fragments VE-EC1-4His seuls ou mélangés avec le fragment VE-EC1-3 sont si proche. Il serait donc très enrichissant de déterminer si des complexes mixtes existent en solution. Aucune interaction mixte n'a cependant été observée à ce jour entre des fragments de VE-cadhérine. Néanmoins, ces résultats confirment l'importance du domaine EC4 dans les interactions entre fragments extracellulaires de VE-cadhérine.

IV.3.4 Conclusion sur l'étude du fragment VE-EC1-4His

Nous avons réalisé des monocouches de fragments extracellulaires VE-EC1-4His par greffage à des lipides chélatant un ion Ni^{2+} . L'étude par ellipsométrie de ces monocouches a montré que les fragments VE-EC1-4His étaient sensibles aux variations de calcium en sous-phase. L'appauvrissement de la sous-phase en calcium entraîne une diminution de la masse adsorbée apparente indiquant qu'une partie des fragments sont ancrés à la surface des lipides sous forme de complexes antiparallèles.

Le profil de densité électronique perpendiculaire à la monocouche de fragment indique clairement trois sur-densités électroniques pouvant être attribuées aux domaines de VE-cadhérine et suggère que les fragments VE-EC1-4His puissent interagir de manière antiparallèle décalée d'un domaine.

Les expériences de réflectivité X effectuées sur des monocouches formées en présence de mélanges de fragment VE-EC1-4His avec un fragment plus court semblent indiquer que seuls les fragments VE-EC2-4 et VE-EC3-4 interagissent avec le fragment VE-EC1-4His les empêchant son ancrage aux lipides. L'expérience effectuée avec le mélange impliquant le fragment court VE-EC1-3 ne permet pas d'affirmer si les fragments ont interagi ou non. Les expériences indiquent que la présence du module EC4 est nécessaire à la formation de complexes. Ainsi à la différence des fragments VE-EC1-4His, les complexes mixtes de fragments de VE-cadhérine pourraient être parallèles.

IV.4 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre une étude de fragments extracellulaires de cadhérine par ellipsométrie et réflectivité des rayons X. Pour ce faire, les fragments étaient immobilisés sous une monocouche de lipides déposés à la surface de l'eau.

Nous avons décrit des profils de densité électronique de fragments extracellulaires de cadhérine. Les profils obtenus sont tout à fait comparables à la littérature du point de vue des épaisseurs des monocouches formées. Ils indiquent que l'épaisseur de la monocouche de fragments C-EC1-5His de C-cadhérine est de 16 nm, indiquant que les protéines sont inclinées par rapport à la surface de l'eau et vraisemblablement courbées d'une manière qui est proche de la structure cristallographique obtenue par T. Boggon *et al.* [Boggon 2002]. Cependant, dans le modèle d'interaction que proposent les auteurs, les fragments C-EC1-5His interagissent au niveau des domaines N-terminaux de façon anti-parallèle, ce qui paraît incompatible avec nos résultats.

Nos résultats se rapprochent de ceux de D. Leckband *et al.* qui ont montré que les fragments de C-cadhérine interagissent selon trois types d'association dans lesquelles les domaines extracellulaires sont décalés [Leckband 2000]. Nos résultats sont compatibles avec un modèle d'enchevêtrement complet des fragments de C-cadhérine. En ce qui concerne le fragment de VE-cadhérine qui est plus court d'un domaine extracellulaire, l'épaisseur de la monocouche est de 21 nm et des sur-densités semblent marquer un alignement ordonné des domaines extracellulaires. Ces résultats sont compatibles avec la présence d'un complexe antiparallèle hexamérique décalé d'un domaine, comme celui proposée par P. Legrand *et al.* [Legrand 2001]. Cet assemblage paraît plus rigide et moins facile à dissocier que les complexes de C-cadhérine, probablement dimériques. Cela suggère une plus grande affinité entre les fragments constituant l'hexamère de VE-cadhérine qu'entre ceux constituant les complexes de C-cadhérine.

Des expériences d'ellipsométrie et de réflectivité X effectuées en présence de solutions à concentrations variables en calcium ont montré dans les cas des deux cadhérines que des complexes antiparallèles étaient présentes au sein de la monocouche, confirmant les modèles antiparallèles d'association entre fragments extracellulaires de C- et de VE-cadhérine. Ainsi, la diminution de la concentration en calcium de la sous-phase a fait apparaître à la fois une perte de la masse apparente adsorbée et une déstructuration des couches.

La localisation des interactions le long des fragments et la détermination précise des domaines impliqués dans les interactions restent délicates. Dans le cas des mélanges de fragments de C-cadhérine, il semble que les fragments de longueurs différentes n'interagissent pas et que seuls les fragments possédant une étiquette polyhistidine se fixent à la monocouche de lipides. Il ne semble pas que les fragments courts se soient intégrés à la monocouche de fragment extracellulaire entier C-EC1-5His de manière collective ou spécifique, c'est-à-dire par reconnaissance de sites de fixation sur le fragment entier avec la même orientation, ce qui n'exclut pas une adsorption non spécifique.

Dans le cas de mélanges de fragments de VE-cadhérine, nos résultats semblent indiquer que les fragments courts interagissent avec les fragments longs de manière parallèle. Il se pourrait que les complexes de fragments de VE-cadhérine se forment en deux étapes : des interactions parallèles, puis une association entre cadhérines de manière antiparallèle. Dans ce cas, les complexes *cis* seraient complètement enchevêtrés puisque les cadhérines sont côte à côte sur la membrane cellulaire. Puis, l'interaction entre cadhérines de cellules opposées se feraient en plusieurs étapes d'enchevêtrements successifs.

D'après nos résultats sur la VE-cadhérine, le domaine EC4 semble nécessaire à la formation de complexes mixtes. Cela confirme les résultats de S. Bibert qui indique la formation de dimères de fragments VE-EC2-4 et VE-EC3-4. Ces dimères pourraient être parallèles. En revanche, les domaines EC1 et EC2 de VE-cadhérine ne permettraient pas seuls d'établir d'interaction, puisque les fragments VE-EC1-3 et VE-EC1-4His ne semblent pas interagir. Cette interprétation est différente des résultats obtenus pour les cadhérines classiques de type I où de nombreux travaux font état d'une interaction au niveau des domaines EC1 et EC2.

Cependant, d'après M. Renaud-Young *et al.*, les fragments extracellulaires de cadhérine s'assembleraient en dimères *cis* et cette association serait remplacée par l'interaction *trans* pour former des dimères antiparallèle [Renaud-Young 2002]. De plus, Iino *et al.* ont montré que la E-cadhérine forme des oligomères de deux à dix protéines à la surface libre de la cellule [Iino 2001]. Nous proposons un modèle d'interaction entre cadhérines dans lequel les fragments extracellulaires pourraient s'assembler en plusieurs étapes. La Figure 107 représente schématiquement ce modèle. (a) Les fragments extracellulaires pourraient s'associer en complexes parallèles à la surface cellulaire. Puis, lorsque les cellules viennent en contact, les extrémités N-terminales (domaine EC1) pourraient se reconnaître en plusieurs étapes intermédiaires (b) avant que les fragments ne se recouvrent entièrement (c). Ce modèle permet de rendre compte des différents modèles actuels et concernant principalement l'importance des extrémités N-terminales [Shapiro 1995, Pertz 1998, Renaud-Young 2002] et l'association entre fragments en plusieurs étapes [Leckband 2002]. Il pourrait également rassembler les deux modèles proposés par l'équipe de D. Gulino [Legrand 2001] et [Bibert 2002]. Il est donc nécessaire de le valider par les quelques autres expériences proposées ci-dessus.

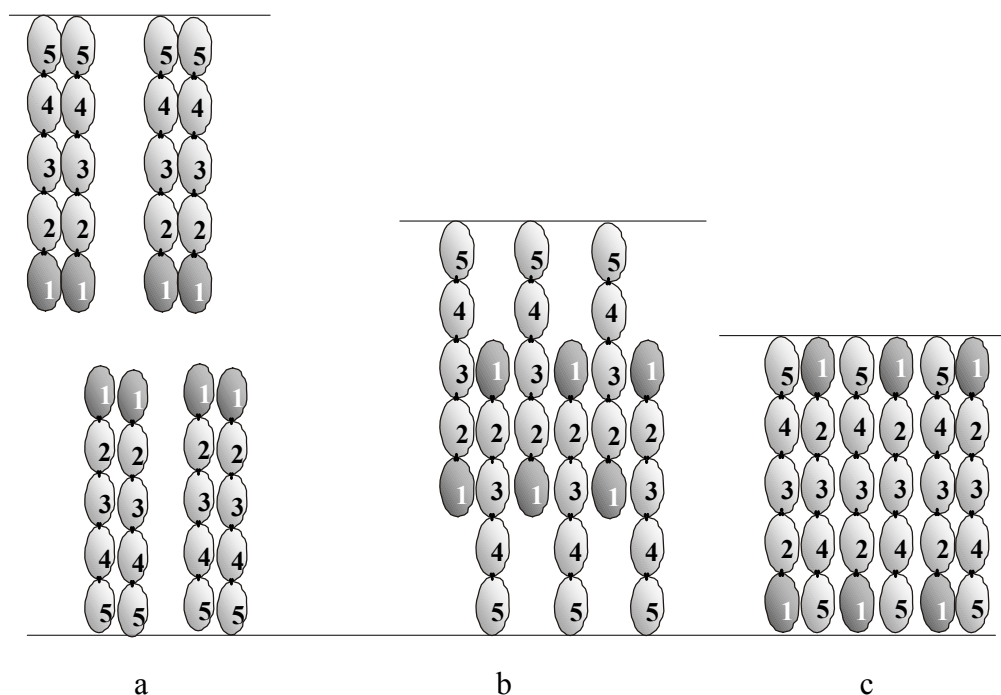


Figure 107 : modèle d'interaction entre fragments extracellulaires de VE-cadhérine en plusieurs étapes. a) interaction *cis* à la surface des cellules préalable aux interactions antiparallèles entre cadhérines appartenant à deux cellules voisines; b) et c) interactions *trans* en deux étapes mettant en jeu des hexamères de VE-cadhérine selon le modèle (b) de P. Legrand *et al.* [Legrand 2001] et (c) Bibert *et al.* [Bibert 2002]

Les résultats préliminaires obtenus sur les fragments de VE cadhérine sont prometteurs. Les techniques utilisées dans ce travail permettent de mettre en évidence l'ancrage de fragments sur la cadhérine entière et l'analyse des interactions entre domaines extracellulaires de cadhérine. Il est certain que des études complémentaires sont nécessaires pour obtenir une analyse complète. Des expériences sont en cours à l'I.B.S. dans le cadre des thèses de R. Al-Kurdi et de S. Bibert. Elles concernent d'abord la caractérisation biochimique des mélanges de fragments de VE cadhérine de différentes compositions. Plus particulièrement, des expériences d'ellipsométrie devront être reproduites pour connaître la quantité de protéines ancrées lors du décrochage des fragments par dilution du calcium. Il serait très intéressant de poursuivre l'étude des formations de monocouche en présence de mélanges de fragments VE de différentes tailles. Par ailleurs, des cristaux bi-dimensionnels de fragments VE-EC1-4His ont été obtenus par R. Al-Kurdi pour de faibles concentrations en fragments, c'est-à-dire sous forme monomérique et pour une concentration en calcium très élevée. La résolution de leur structure, en cours d'analyse, apportera des informations riches sur les interactions latérales dans le plan de la monocouche.

Au cours de ce travail, nous avons mis en place une méthodologie adaptée à l'étude des protéines d'adhérence cellulaire. Par mesures ellipsométriques, nous avons pu caractériser la masse apparente de protéines adsorbées dans la monocouche en fonction de changements opérés dans la sous-phase. Ces variations de masse adsorbée ont pu être reliées à des changements de la structure des couches dans la direction perpendiculaire à la surface par mesure de la réflectivité X. Cependant, nous avons également pu constater les limitations de ces métho-

des pour l'étude des interactions entre fragments de cadhérine. En effet, la concentration en calcium en surface est probablement plus élevée qu'en solution, du fait de la compacité de la couche de protéine. Cela se traduit par un ralentissement des effets de dilution de la sous-phase ou de l'ajout d'un agent chélatant le calcium. Par ailleurs, l'utilisation de fragments courts est délicate en raison des fortes variations d'affinité entre fragments de différentes longueurs. Entre les deux méthodes employées pour étudier les interactions entre fragments de longueurs différentes, la méthode consistant à mélanger les fragments préalablement à l'injection semble la plus efficace.

Chapitre V Caractérisation de films minces par résonance des plasmons de surface

V.1 Présentation

En 1995, Liedberg *et al.* ont les premiers eu l'idée d'utiliser la résonance des plasmons de surface pour étudier des molécules biologiques adsorbées à la surface d'une couche mince de métal déposée sur un substrat solide [Liedberg 1995]. Ce travail est à l'origine de la création de l'appareil commercial Biacore (Pharmacia) qui utilise une mesure de la résonance des plasmons de surface pour détecter la présence de molécules adsorbées sur une surface d'or [Biacore 1]. Grâce à cet appareil, la technique de résonance des plasmons de surface est utilisée couramment dans les laboratoires de biologie pour étudier les affinités entre molécules adsorbées et en solution [Green 2000].

Nous utiliserons l'acronyme SPR pour désigner la technique expérimentale de mesure de la résonance des plasmons de surface.

V.1.1 Pourquoi un SPR ?

Un projet de recherche de notre laboratoire est d'étudier la croissance de cristaux bidimensionnels de protéines sur une surface solide. Il est envisagé d'étudier la structure des protéines par diffraction des rayons X en incidence rasante (en anglais *grazing incidence diffraction*, GID) ou par AFM. Bien que les études par AFM soient plus répandues, la GID a suscité beaucoup d'intérêt depuis les travaux de H. Haas sur la cristallisation à deux dimensions de la streptavidine [Haas 1995]. La diffraction en incidence rasante est utilisée classiquement pour l'étude de la surface des solides [Vineyard 1982, Sauvage-Simkin 1994], mais aussi pour celle de la structure de monocouches d'amphiphiles déposées à la surface de l'eau [Kjaer 1987, Daillant 1996]. Cette technique a récemment été élargie à l'étude de trois protéines formant des cristaux bi-dimensionnels à l'interface air-eau [Lenne 2000, Lenne 1998, Berge 1998]. Il serait intéressant d'adapter cette technique à l'étude de monocouches de protéines cristallisées sur une surface solide.

Deux méthodes de croissance des cristaux sont couramment employées. Une première méthode consiste à faire croître les cristaux directement sur le substrat solide [Reviakine 1998]. Dans une deuxième méthode, les cristaux sont élaborés

à l'interface air-eau avant d'être transférés sur le substrat [Calvert 1997, Scheuring 2002]. Ainsi, Scheuring *et al.* ont obtenu une image par AFM de la protéine cristallisée avec une résolution allant jusqu'à 1 Å verticalement et 7 Å latéralement [Scheuring 2002].

Dans les deux cas, une technique de caractérisation des couches de protéine est nécessaire préalablement à l'étude structurale. La résonance des plasmons de surface, qui permet de déterminer la quantité de matière greffée sur le substrat s'est avérée efficace [Homola 1999]. L'équipe de D. Leckband l'utilise pour déterminer le taux de surface recouverte par les protéines avant étude par mesure de force de surface [Sivasankar 2001a].

V.1.2 Assemblages de macromolécules sur substrats solides

Les couches formées sur une surface solide présentent plusieurs avantages par rapport aux couches déposées à la surface de l'eau. Tout d'abord, elles sont nettement plus faciles à manipuler et bien moins fragiles. Le lavage des surfaces pour rincer la surface ou injecter un nouvel échantillon devient très simple. Il devient possible de passer des solutions en continu sur la surface afin de conserver une concentration constante en soluté dans la sous-phase (cette méthode est utilisée dans la technologie Biacore (Pharmacia) [Biacore 2]). L'étude des interactions entre les protéines ou avec d'autres molécules se trouve ainsi facilitée. De multiples techniques de dépôts standard existent et sont très utilisés en biologie, notamment grâce au développement du Biacore et des biopuces. Par ailleurs, les expériences utilisant des rayons X, de réflectivité ou de diffraction en incidence rasante, sont largement facilitées puisqu'il est possible d'incliner l'échantillon par rapport au faisceau. Concernant la cristallisation des protéines, le principal inconvénient est la rugosité du matériau qui peut empêcher la formation de cristal. Le choix de la surface est donc crucial pour l'obtention des cristaux [Calvert 1997].

V.1.3 L'appareil de mesure de la résonance des plasmons de surface

Nous avons initialement développé l'appareil de SPR afin d'étudier les interactions entre des fragments de cadhérine déposés sur une surface solide et d'autres fragments de cadhérine en solution. Un second objectif était leur cristallisation à deux dimensions sur un substrat solide. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe de D. Leckband de l'U.I.U.C., avec l'aide de S. Sivasankar. Nous avons également tiré parti de la collaboration de notre laboratoire avec le groupe de Y. Lévy à l'Institut d'Optique Théorique et Appliquée (I.O.T.A., Saclay). La fabrication de notre appareil SPR s'inspire de l'appareil développé à l'U.I.U.C. par N. Lavrik *et al.* [Lavrik 2000] et de celui mis au point par Y. Lévy et Ph. Guédon à l'IOTA [Guédon 2000a, Guédon 2000b].

V.2 Résonance des plasmons de surface

V.2.1 Existence des plasmons de surface

Les plasmons de volume sont des quasi-particules associées aux oscillations collectives longitudinales des électrons de conduction d'un métal. La fréquence minimale à laquelle peuvent être excités les plasmons de volume est appelée fréquence plasma $\omega_p = \frac{4\pi\rho_e e^2}{m}$ où ρ_e est la densité volumique d'électrons du métal, e la charge et m la masse de l'électron. Les plasmons de surface sont leurs équivalents confinés à la surface du métal. La fréquence plasma de surface est reliée à la fréquence plasma par la relation $\omega_s = \frac{\omega_p}{\sqrt{1+\epsilon_d}}$ où ϵ_d est la constante diélectrique du milieu extérieur au métal. Cette relation de $\omega_s(\epsilon_d)$ indique que l'énergie des plasmons varie selon le milieu adjacent au métal.

Le champ électromagnétique de surface associé aux plasmons de surface peut être considéré comme une onde longitudinale évanescente de vecteur d'onde \mathbf{k}_{ps} . La relation de dispersion pour les plasmons de surface s'écrit :

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d} \right)^{1/2} \quad \text{Équation 5}$$

où ϵ_m est la constante diélectrique du métal, ω la fréquence de l'onde et c la vitesse de la lumière dans le vide [Otto 1968, Davies 1996].

V.2.2 Comment exciter un plasmon de surface

V.2.2.1 Onde évanescente

Lorsqu'un champ électromagnétique est incident sur un matériau à un angle supérieur à l'angle critique, il se réfléchit totalement, mais une onde évanescence se propage aussi à l'interface entre les deux milieux (voir Annexe 3). Le vecteur d'onde évanescence \mathbf{k}_s est confiné à l'interface et s'écrit en fonction du vecteur d'onde du champ électromagnétique incident \mathbf{k}_i : $\mathbf{k}_s = \mathbf{k}_i \sin(\alpha)$, où α est l'angle d'incidence par rapport à la normale à la surface (Figure 108).

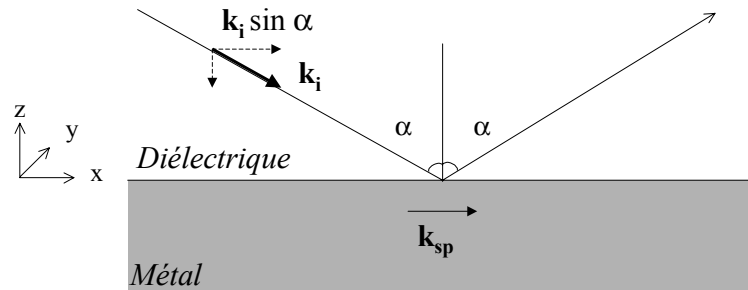


Figure 108 : Projection parallèle à la surface du vecteur d'onde du champ incident indiquant la résonance des plasmons de surface à l'interface entre un diélectrique et un métal.

Le module du vecteur d'onde incident projeté sur l'interface s'écrit :

$$k_s = \sqrt{\varepsilon} \frac{\omega}{c} \sin \alpha \quad \text{Équation 6}$$

où ε est la constante diélectrique du milieu incident. L'angle critique à l'interface verre-air est égal à $\alpha_c = 41,3^\circ$, pour un indice de réfraction du verre égal à 1.515 et $\alpha_c = 61,7^\circ$ à l'interface verre-eau.

Si une fine couche de métal est insérée entre le milieu incident (verre) et le milieu ambiant (air ou eau) (Figure 109), l'onde évanescente peut exciter des plasmons de surface à l'interface entre le métal et le milieu ambiant. L'atténuation de l'onde évanescente est exponentielle dans la direction normale à la surface. Par conséquent, la couche métallique doit être assez fine pour que suffisamment d'énergie parvienne à l'interface métal-milieu ambiant et soit utilisée dans la création d'un plasmon de surface.

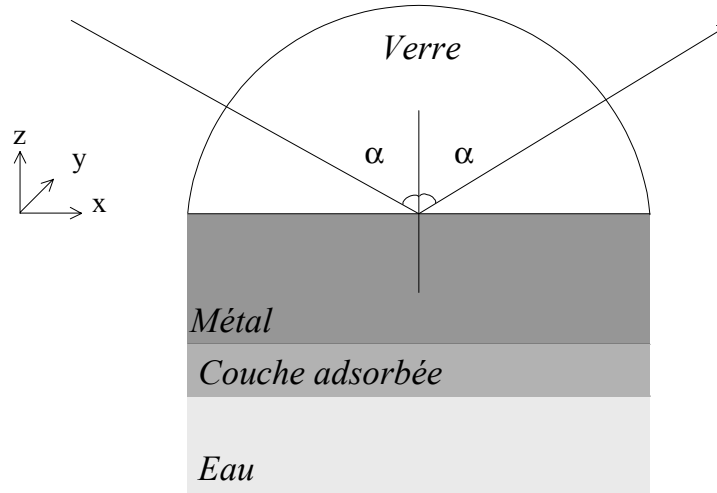


Figure 109 : Représentation du système utilisé pour créer les plasmons de surface.

V.2.2.2 Condition de résonance

La conservation de la composante parallèle à la surface du vecteur d'onde permet de trouver la condition de résonance entre le champ incident et les plasmons de surface : $k_s(\omega) = k_{sp}(\omega)$. A partir des Équation 5 et Équation 6 la condition de résonance s'écrit:

$$\sqrt{\varepsilon} \sin \alpha = \sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \quad \text{Équation 7}$$

Cette condition indique qu'il ne peut pas y avoir de résonance si le milieu diélectrique est l'air ($\varepsilon=1$) car pour une fréquence ω donnée, le vecteur d'onde des photons sera toujours inférieur à celui des plasmons quelque soit l'angle d'incidence α . En revanche, pour un diélectrique d'indice de réfraction supérieur à 1 et un métal donnés, la condition de résonance définit un angle d'incidence α_R , qui est appelé angle de résonance des plasmons de surface.

L'onde associée à un plasmon de surface étant longitudinale, le champ électromagnétique incident doit être polarisé dans la plan d'incidence (polarisation p).

V.2.2.3 Détection d'une couche mince déposée sur le métal

L'angle de résonance des plasmons de surface α_R dépend de la constante diélectrique ϵ_a apparaissant dans l'Équation 7, qui est celle du milieu ambiant. Si une couche de molécules est adsorbée à l'interface entre le métal et le milieu ambiant (Figure 109), la constante diélectrique et l'angle de résonance sont modifiés. Une mesure de l'intensité réfléchie de la lumière polarisée p sur un tel système permet en principe de déterminer l'épaisseur et l'indice de réfraction complexe d'une couche déposée sur l'or. Cette configuration est appelée configuration Kretschmann, d'après E. Kretschmann qui l'a développé en premier en 1971. Par ailleurs, dans le cas où la couche est déposée par un processus cinétique, les variations de l'intensité réfléchie p à un angle fixe permettent de suivre l'adsorption en temps réel.

V.2.3 Simulations de courbes de résonance des plasmons de surface

La description de l'interaction entre une onde électromagnétique et un milieu stratifié faite dans le Chapitre I permet de calculer une courbe d'absorption, due à la résonance des plasmons de surface. Il est possible de calculer les intensités réfléchies pour les polarisations p et s d'une onde incidente en fonction de l'angle d'incidence. Les paramètres d'entrée sont la longueur d'onde et les constantes diélectriques complexes à cette longueur d'onde des matériaux constituant le système : verre, métal, molécule, eau.

La Figure 110 compare les intensités réfléchies pour les composantes p et s sur un système verre-eau et verre-or-eau. L'angle critique de l'interface verre-eau est visible à $61,7^\circ$ pour les deux composantes de polarisation de la lumière p et s . Lorsqu'une couche mince d'or est insérée entre le verre et l'eau, la résonance des plasmons de surface apparaît à un angle d'incidence de $71,5^\circ$. Elle se traduit par une chute d'intensité réfléchie polarisée p . Les courbes ont été calculées pour une longueur d'onde $\lambda=633$ nm. Les paramètres d'entrée sont :

- milieu incident : verre $n=1,515$ et $\kappa=0$;
- couche métallique : or $n=0,2$, $\kappa=3,42$; épaisseur 42 nm;
- milieu ambiant : eau $n=1,333$, $\kappa=0$.

Si une couche de matière organique est déposée sur le métal, la fréquence de résonance des plasmons de surface est décalée, ce qui se traduit par un déplacement du minimum d'absorption. La Figure 111 présente deux courbes mettant en évidence ce phénomène. L'angle résonance des plasmons de surface est visible à $72,08^\circ$ pour le système verre-or-eau et à $73,31^\circ$ pour le système verre-or-film-eau. Les paramètres utilisés sont les mêmes que précédemment, avec une couche supplémentaire intercalée entre les couches d'or et d'eau :

film organique : $n=1,4$, $\kappa=0$; épaisseur 10 nm.

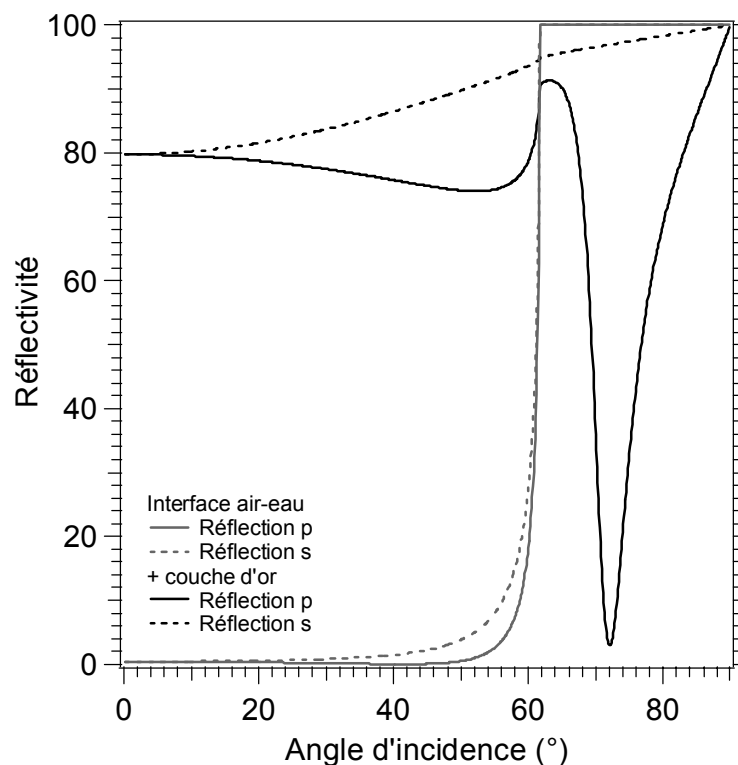


Figure 110 : Courbes de réflectivité des composantes p et s d'une onde électromagnétique. Conditions : $\lambda=633$ nm, couche métallique or $n=0,2$, $\kappa=3,42$, épaisseur 42 nm, milieu diélectrique verre $n=1.515$ et $\kappa=0$, milieu ambiant eau $n=1,333$, $\kappa=0$.

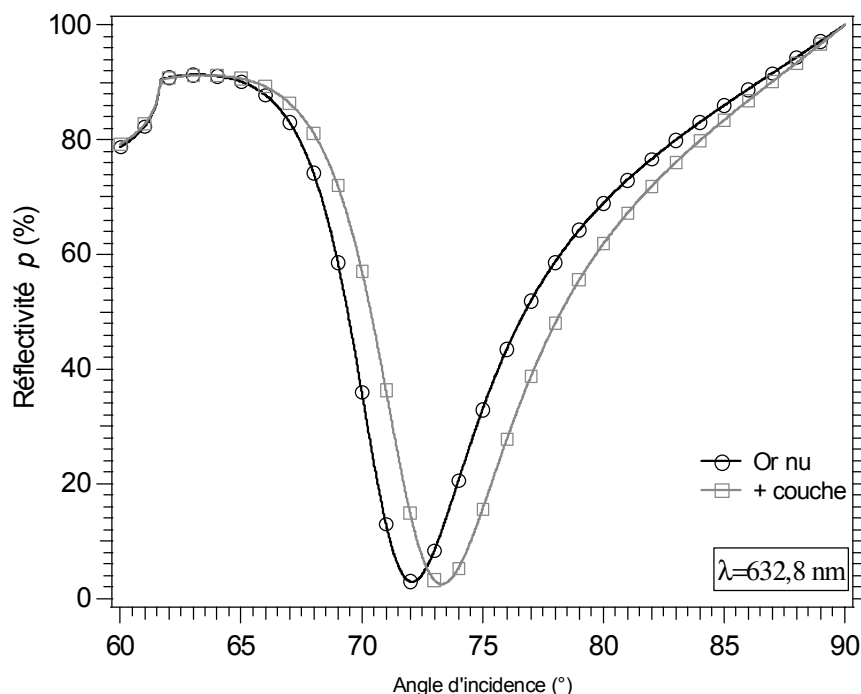


Figure 111 : Variation de la courbe d'absorption. Courbe sur or : mêmes conditions que pour la Figure 110. Couche supplémentaire $n=1,42$, $\kappa=0$, épaisseur 10 nm.

Théoriquement, une couche organique de 10 nm déposée à la surface de l'or conduit à un déplacement de $1,23^\circ$ du minimum de résonance. Cela représente une résolution théorique de $0,123\text{ }^\circ/\text{nm}$. Cette résolution dépend fortement de la

longueur d'onde utilisée et des paramètres caractéristiques de la couche de métal. Dans les conditions présentées, la variation du minimum de résonance est linéaire avec les variations de l'épaisseur jusqu'à 60 nm avec une erreur relative de 1% (calculs par le programme *Fresnel*).

V.3 Réalisation d'un appareil de mesure de la résonance des plasmons de surface

Le dispositif que nous avons réalisé au laboratoire est constitué des éléments suivants. La source de lumière utilisée est un laser He-Ne standard (5 mW, $\lambda=632,8$ nm, Melles-Griot), polarisé linéairement. Le faisceau est atténué soit par un filtre, soit par un polarisateur dont l'axe est décalé par rapport à la polarisation p . L'échantillon est déposé sur une lamelle de microscope recouverte d'une couche mince d'or d'épaisseur nominale 45 nm²⁴ (verre B270 de dimension 30×25×1 mm³, SAGEM) accolée à un demi-cylindre de verre (verre BK7 de dimensions 25×25 mm², cylindre de rayon 12,5 mm coupé à 11,5 mm, Hellma). Un liquide d'indice légèrement supérieur à celui du verre est inséré entre le cylindre et la lamelle afin d'assurer un bon contact optique. L'intensité réfléchie est détectée par une photodiode appelée par la suite "photodiode-signal" (photodiode au silicium 5 mm², Centronic). Avant l'échantillon, une lame semi-réfléchissante dévie une partie du faisceau vers une seconde photodiode identique, appelée "photodiode de référence", afin de s'affranchir des fluctuations du faisceau laser. Les signaux reçus par les deux photodiodes sont convertis par une carte d'acquisition en mode de conversion analogique-digital (KPCI 3101, Keithley).

La cellule échantillon consiste en une cuve en Teflon circulaire de 6 mm de diamètre et 0,5 mm de profondeur (volume 14 μ L). L'étanchéité entre la cellule en Teflon et la surface d'or est assurée par un joint circulaire en Teflon. L'injection des échantillons et la circulation de solutions est effectuée manuellement via deux ouvertures percées dans le fond de la cuve. La Figure 112 illustre ce dispositif expérimental, présenté sur les photographies des Figure 113 et Figure 114.

La cellule échantillon et le cylindre de verre d'une part et la photodiode-signal d'autre part sont placés sur deux platines de rotation (Microcontrole) permettant d'effectuer des mesures à angles variables. Les mouvements des platines de rotation sont effectués par deux moteurs pas à pas (MAE) alimentés et contrôlés par un système de commande multi-axe (Paragon, Parker) composés de deux modules de puissance (L50Di, Parker).

Le pilotage des moteurs et l'enregistrement des intensités lues par les photodiodes est effectué par l'intermédiaire d'un programme informatique que nous avons écrit en langage Pascal Objet (logiciel Delphi, Borland). Le programme enregistre la position des moteurs et l'intensité reçue par les deux photodiodes.

²⁴ Une mince couche de chrome de quelques dixième de nm est déposée sur les lamelles de verre pour une meilleure adhérence de la couche d'or.

Il permet d'effectuer des mesures angulaires et des études de cinétiques à angle fixe (voir la Figure 115).

Nous avons choisi d'utiliser un cylindre de verre afin que la direction du faisceau laser passe par le centre rotation de la platine de rotation de l'échantillon. Cela permet au faisceau laser de fixer un point de l'échantillon (voir la Figure 112). Dans un premier montage, nous avons utilisé un cube de verre à la place du cylindre. Le faisceau était dévié à l'intérieur du cube selon le lois de Snell-Descartes et balayait l'échantillon pendant les mesures angulaires. Cela est gênant si l'échantillon n'est pas parfaitement homogène à l'échelle du faisceau (diamètre 1 mm).

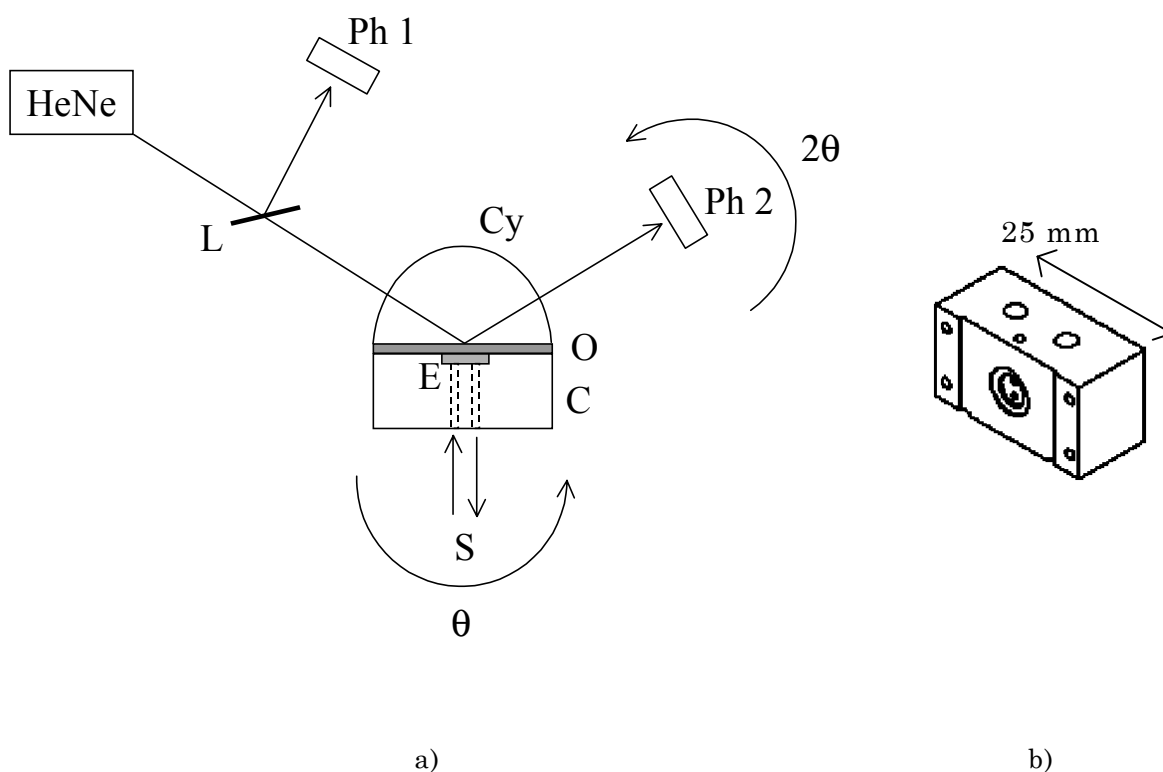


Figure 112 : a) Vue de dessus du dispositif expérimental du SPR. HeNe : laser; C : cellule en Teflon; Cy : cylindre en verre; L : lame semi-réfléchissante; E : cuve échantillon; O : couche mince d'or déposée sur lamelle de verre accolée au cylindre; Ph1 : diode de référence, Ph2 : diode signal; S : entrée et sortie des solutions par seringue Hamilton ou reliées à des tubes capillaires en Teflon; θ : angle de rotation de la platine échantillon, 2θ : angle de rotation de la photodiode signal. B) Cellule en Teflon, avec la cuve échantillon circulaire au centre (14 μ L).

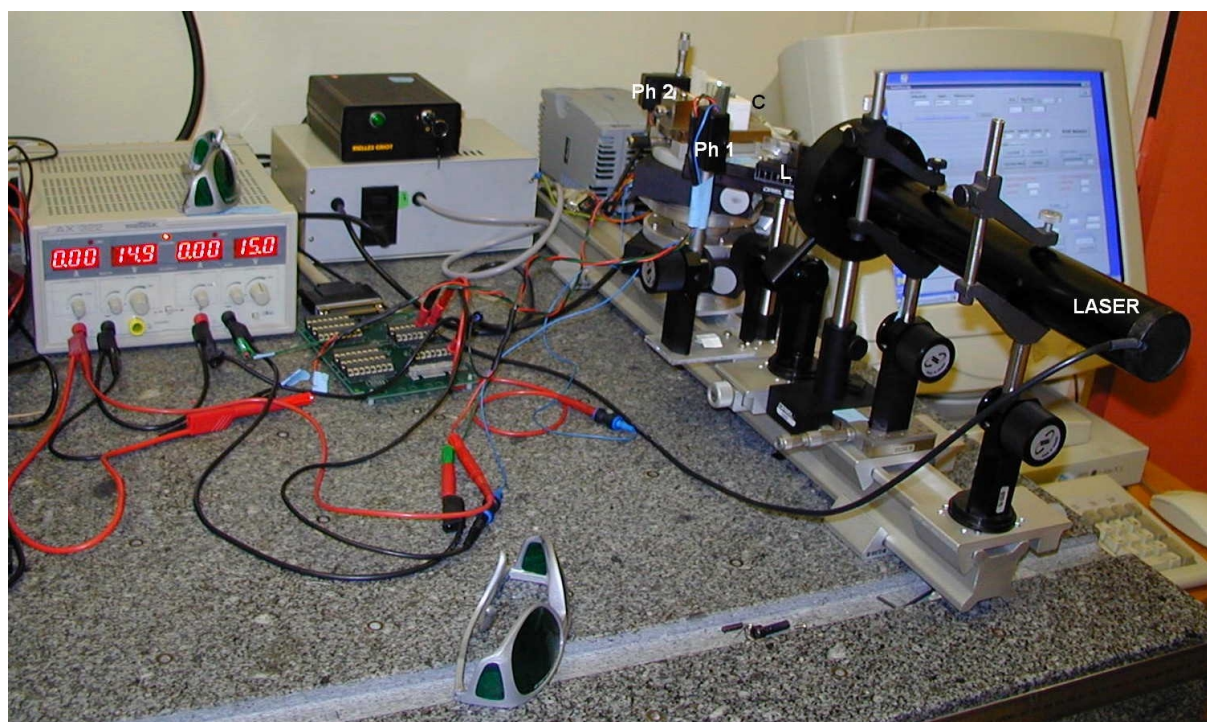


Figure 113 : Dispositif expérimental du SPR. C : cellule en Teflon; Ph1 : diode de référence, Ph2 : diode signal; L : lame semi-réfléchissante.

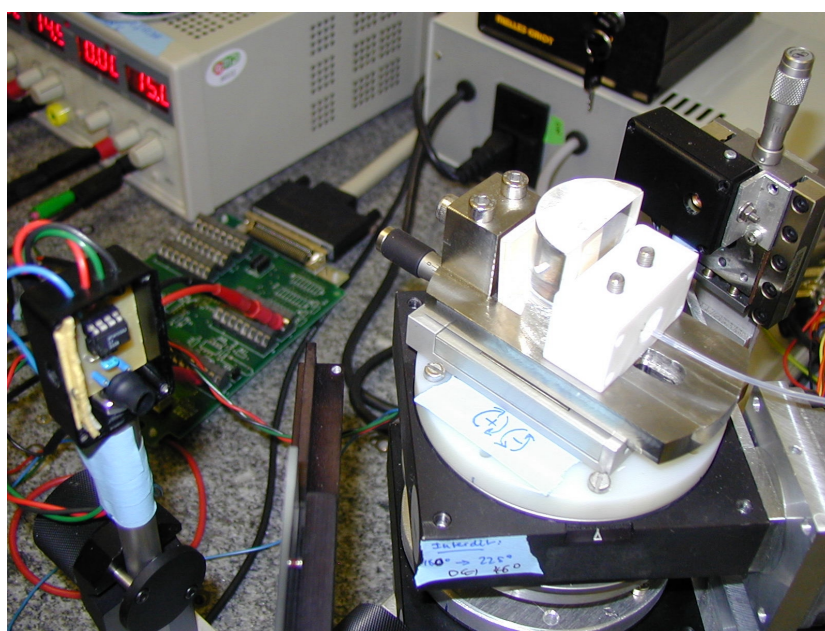


Figure 114 : Agrandissement de la cellule échantillon fixée sur une platine motorisée.

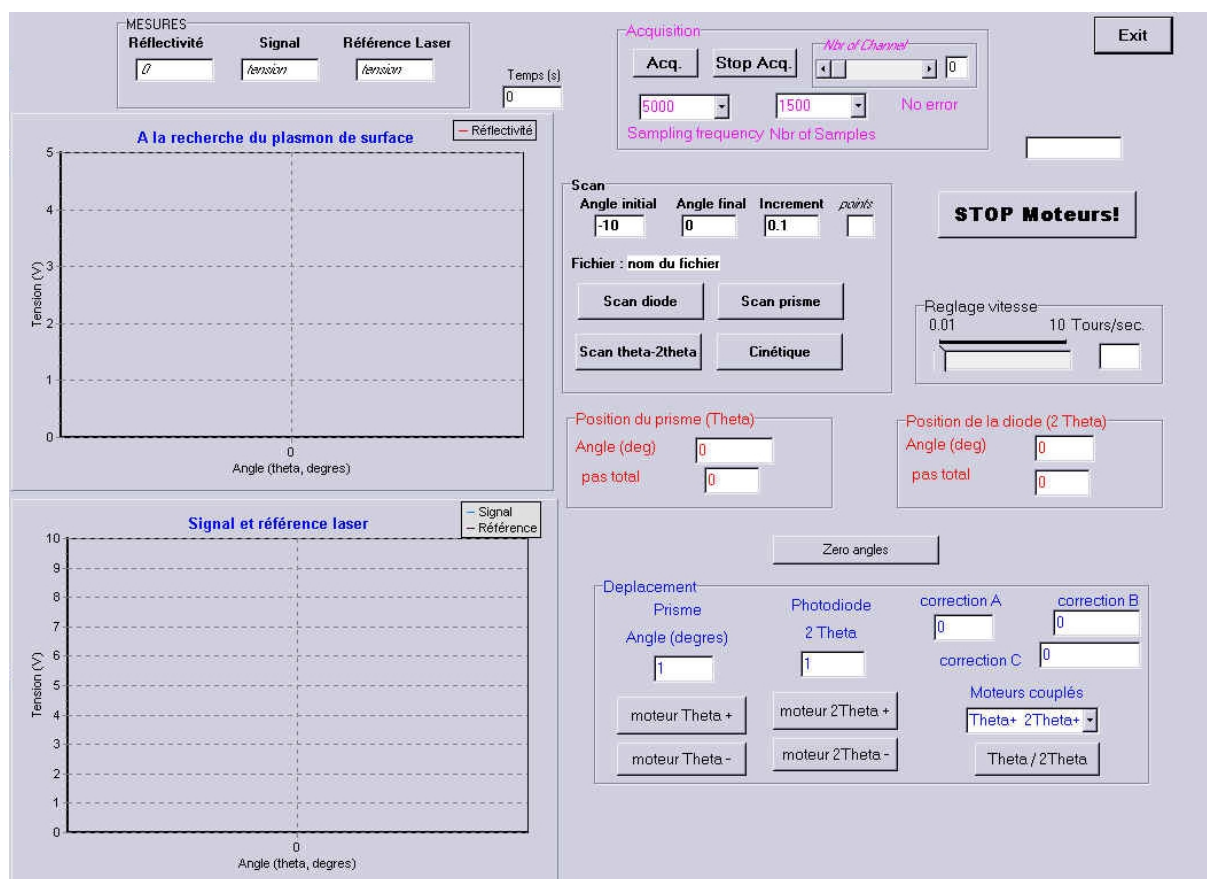


Figure 115 : Ecran de contrôle du programme d'acquisition SPR permettant le mouvement des moteurs et l'enregistrement des intensités lues par les deux photodiodes et la réalisation de mesure cinétique à angle fixe et de mesure par balayage angulaire.

V.4 Applications : détection de multicouches organiques

Les premières utilisations de l'appareil de mesure de la résonance des plasmons de surface ont fait l'objet de travaux en collaboration dont nous présentons ici les principaux aspects.

V.4.1 Immobilisation d'avidine sur un film de polypyrrole biotinylé

Une première collaboration au sein de notre laboratoire a concerné le stage de d'Alice Timperley [Timperley 2002]. Nous avons co-encadré ce projet avec Martial Billon et Jean-François Legrand.

L'objet du stage était l'étude d'un assemblage composé d'avidine et d'un polymère conducteur électronique, le polypyrrole, fonctionnalisé par des entités biotine (Annexe 5). Les travaux d'A. Timperley se sont décomposés en trois étapes : (1) la synthèse de deux types de monomère pyrrole couplé à une molécule de biotine par l'intermédiaire d'un bras espaceur de longueur variable, (2) l'électrosynthèse de films de polypyrrole biotinylés et leur caractérisation électrochimique par voltampérométrie cyclique, (3) l'immobilisation d'avidine sur les films de polymères caractérisée par des mesures de fluorescence, de microbalance à quartz, et par mesure de résonance des plasmons de surface. Nous avons parti-

cipé à l'encadrement de la troisième étape de ce stage. Ce travail a consisté dans un premier temps en le montage et le réglage fin de l'appareil de SPR, puis nous avons réalisé des mesures préliminaires d'immobilisation d'avidine sur or et sur films de polymères.

Le SPR permet de mesurer en temps réel l'adsorption de molécules sur la surface d'or. La Figure 116 présente une mesure effectuée sur une lame de verre recouverte d'or sur laquelle a été électrodéposé un film mince de polypyrrole biotinylé synthétisé par A. Timperley. Une solution de molécules de streptavidine a été injectée au temps $t=3,5$ minutes. L'immobilisation des protéines sur le polymère par reconnaissance biotine-streptavidine est révélée par le changement de signal de réflectivité. Un rinçage par la solution tampon dans laquelle était diluée la protéine ne produit aucun changement, indiquant que les protéines adsorbées forment un film fortement lié à la biotine.

La Figure 117 présente deux mesures angulaires effectuées sur l'échantillon avant et après l'injection de streptavidine. Nous avons calculé des courbes de résonance des plasmons de surface avec notre programme *Fresnel* (voir III.2, p. 39). Les paramètres utilisés sont indiqués dans le Tableau 20. l'indice de réfraction complexe du polypyrrole utilisé dans ce modèle est comparable à la valeur décrite dans la littérature [Lee 1989, Vork 1990]. Le déplacement de la résonance des plasmons de surface consécutif à l'adsorption de la streptavidine indique que la couche mesure 7 nm avec un indice de réfraction de 1,4. Aux angles supérieurs à la résonance des plasmons de surface, les courbes calculées ne s'ajustent pas aux courbes expérimentales. En revanche, les deux courbes expérimentales avec et sans streptavidine se superposent parfaitement. Nous attribuons cet effet à une mauvaise mesure du signal à ces angles, dû vraisemblablement à la géométrie de l'appareil. Une correction angulaire du mouvement des moteurs devrait être apportée pour obtenir une meilleure mesure à grands angles.

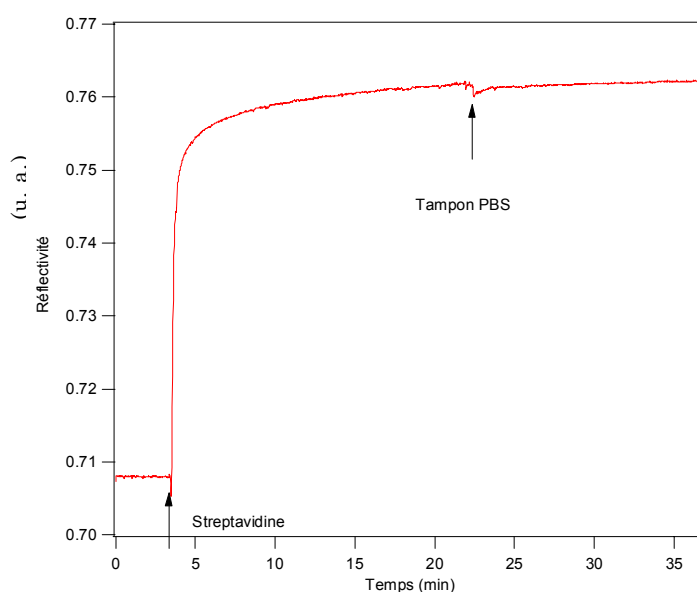


Figure 116 : Mesure cinétique de l'adsorption de la streptavidine sur or, puis rinçage avec une solution tampon PBS. Conditions expérimentales : [streptavidine]=0,25 mg/ml, solution tampon [PBS]=10mM; angle d'incidence 72° .

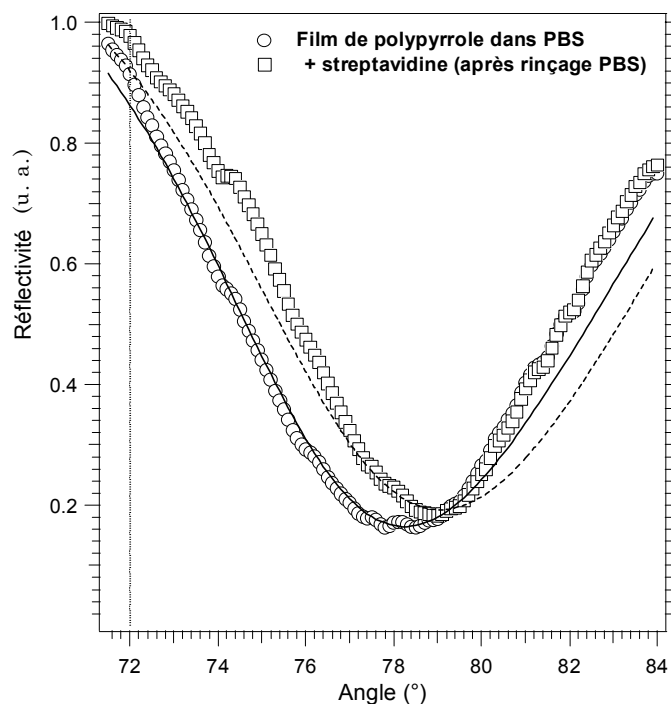


Figure 117 : Mesures angulaires indiquant le déplacement de la résonance des plasmons de surface par la présence de la monocouche de streptavidine ancrée sur le film de polypyrrole biotinylé. Les courbes indiquent des calculs effectués par notre programme *Fresnel* (voir III.2, p. 39).

Couche	Epaisseur (nm)	Indice de réfraction n	Coefficient d'absorption κ
Verre	0	1,515	0
Chrome	1	3,51	1,25
Or	45	0,2	3,42
Polypyrrole	23	1,5	0,045
Streptavidine	7	1,4	0
Tampon	0	1,334	0

Tableau 20 : Paramètres utilisés pour le calcul des courbes de résonance des plasmons de surface présentées sur la Figure 117. Dans le cas du polypyrrole seul, la couche de streptavidine n'a pas été utilisée.

V.4.2 Multicouches de chitosane-ADN

Nous avons participé à une collaboration impliquant Roberto Calemzcuk de notre laboratoire, Pierre Labbé du laboratoire Laboratoire d'Electrochimie Organique et de Photochimie Rédox (LEOPR, UJF, Grenoble), et Gustavo Rivas et son étudiante Laura Pedano (Université de Cordoba, Argentine). Le cadre de cette collaboration est la recherche de nouveaux biocapteurs à ADN à partir de structures organisées de molécules d'intérêt biologiques. En particulier, les multicouches réalisées à partir de dépôts successifs de polyélectrolytes de charges opposées sont d'un grand intérêt. Plus précisément, ce projet concerne l'étude de structures multi-lamellaires obtenues par dépôts successifs de différents ADN (polyanion) et de polycations naturels comme le polysaccharide chitosane et ses

dérivés. Nous avons participé à cette étude en caractérisant les multicouches par mesure de résonance des plasmons de surface.

V.4.2.1 Protocole expérimental

L'ADN utilisé était un ADN double brin de thymus de veau (ADNdb). Il a été dilué dans une solution tampon contenant 50 mM de tampon phosphate à un pH de 7,4. Les solutions préparées contenaient une concentration en ADNdb variant entre 50 µg/ml et 500 µg/ml. Le chitosane a été dilué dans une solution tampon identique et à des concentrations variant de 2 à 8 mg/ml. Le chitosane a été modifié afin de porter une charge positive. L'ADN est naturellement chargé négativement.

Les lamelles recouvertes d'or ont été nettoyées dans un mélange $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1) pendant 5 minutes puis rincées abondamment à l'eau ultra-pure. Pour rendre la surface hydrophobe, une solution d'éthanol saturée en acide mercaptopropionique a été déposée sur les lamelles. Les lamelles étaient ensuite rincées à l'éthanol puis à l'eau ultra-pure avant usage et utilisée immédiatement. Pour chaque expérience, une lamelle ainsi préparée était insérée entre le cylindre de verre et la cellule en Teflon. Les multicouches chitosane-ADNdb ont ensuite été élaborées *in-situ* par injections successives des solutions décrites ci-dessus.

Lors d'une expérience type, une mesure angulaire de résonance des plasmons de surface était d'abord effectuée en présence de solution tampon. Puis, la solution de chitosane était injectée par une seringue Hamilton et l'adsorption suivie en mode cinétique. Plusieurs injections étaient généralement nécessaires pour obtenir une saturation de la surface en chitosane. Une courbe angulaire était mesurée lorsque le signal est stabilisé. Après rinçage de la cellule avec la solution tampon, la solution d'ADNdb était ensuite injectée selon le même processus. Plusieurs couches successives ont ainsi pu être élaborées.

V.4.2.2 Résultats typiques de mesures

Nous présentons deux expériences caractéristiques au cours de laquelle des bicouches chitosane-ADNdb ont été déposées sur le substrat d'or.

La Figure 118 présente une série de courbe angulaire de résonance des plasmons de surface. Ces mesures ont été effectuées avec le cube de verre remplaçant le cylindre de verre mentionné ci-dessus. L'angle externe au cube est représenté en abscisse. Le minimum correspond à l'angle d'absorption due à la création de plasmons de surface. Pour chaque bi-couche déposée cet angle varie d'environ $0,5^\circ$. Nous observons que toutes les courbes se rejoignent aux grands angles, ce qui est vraisemblablement un artéfact de mesure.

La Figure 119 présente une mesure cinétique effectuée sur un échantillon similaire. Les injections successives d'ADNdb et de chitosane sont indiquées par des flèches sur la Figure 119. La courbe de résonance des plasmons de surface se déplace vers les grands angles à mesure que la multicouche est formée. Les mesures cinétiques ont été effectuées à différents angles d'incidence pour rester dans la partie linéaire de la courbe de résonance des plasmons de surface, c'est-

à-dire entre 61° et 65° d'après la Figure 118. Ceci assure de mesurer un signal proportionnel à l'épaisseur et au changement d'indice de la couche supplémentaire.

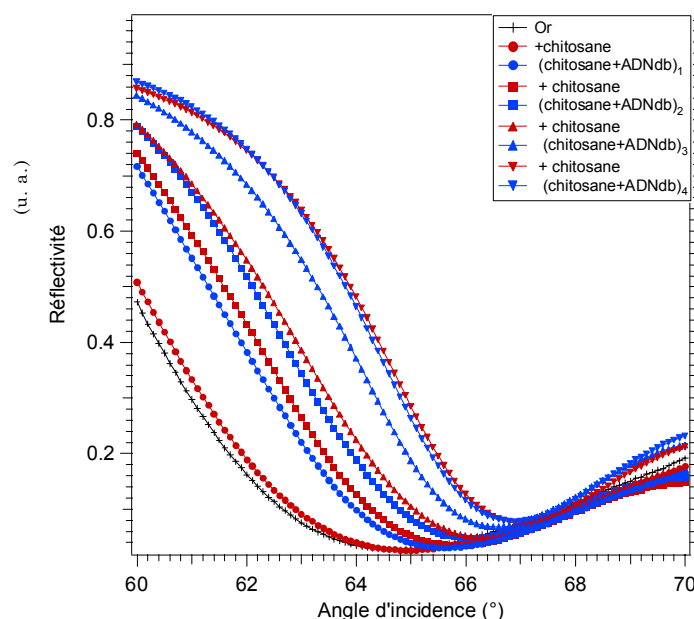


Figure 118 : Mesures angulaires successives mesurées sur une multicouche chitosane-ADNdb. L'angle d'incidence est mesuré à partir du côté du cube employé pour ces mesures.

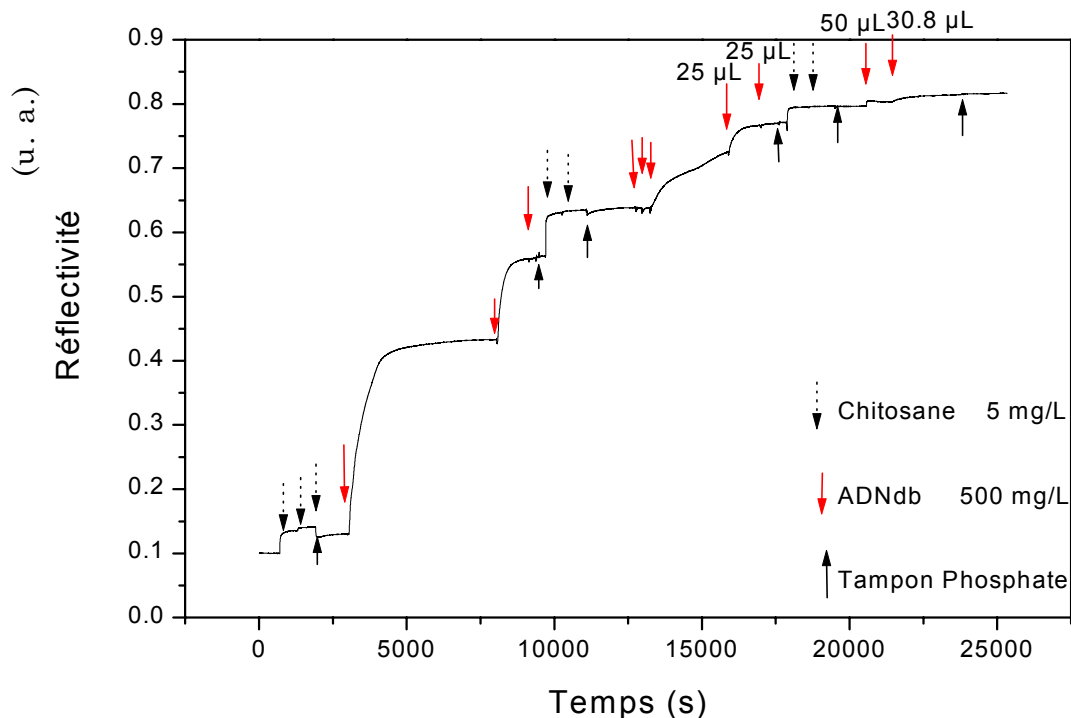


Figure 119 : Mesure cinétique indiquant l'adsorption des couches successives de chitosane et d'ADNdb. Les injections sont de $50\ \mu\text{L}$ sauf indication contraire sur la figure; la concentration de la solution en chitosane est de $5,0\ \text{mg/ml}$ et celle de la solution d'ADNdb de $0,5\ \mu\text{g/ml}$.

V.4.2.3 Conclusions préliminaires

L'ensemble des expériences effectuées ont montré (1) la cinétique d'adsorption du chitosane est plus rapide que celle de l'ADNdb; (2) les changements de l'angle de résonance des plasmons de surface observés après la formation d'une couche d'ADN sont plus importants que ceux observés après la formation d'une couche de chitosane; (3) les changements de l'angle de résonance des plasmons de surface sont moins prononcés et le temps nécessaire pour atteindre la saturation du signal cinétique est allongé lorsque le nombre de couches augmente; (4) le nombre maximum de bicouches que nous avons pu observées est de trois.

Cette étude préliminaire est actuellement poursuivie au LEOPR par P. Labbé en collaboration avec G. Rivas. La stabilité des multicouches composées d'un nombre plus important de bicouches ainsi que l'influence de la force ionique et du pH de la solution tampon sur la formation des multicouches est étudiée. Dans un futur immédiat, G. Rivas s'intéresse à l'influence de la charge du chitosane sur la formation de multicouches et à l'effet de l'ajout de chaînes carbonées, composées de huit carbones, greffées le long de la molécule de chitosane en proportion variable. Ces multicouches ADN-chitosane pourrait être utilisées pour étudier la complexation de métaux ou d'enzymes avec l'ADN.

V.5 Projets futurs

Il serait intéressant d'étudier les monocouches de cadhérines greffées sur substrat solide par la mesure de résonance des plasmons de surface. Nos collaborateurs de l'U.I.U.C. utilisent une méthode de greffage que nous expérimenté lors d'un séjour dans leur laboratoire. La méthode d'ancrage des cadhérines est similaire à celle employée pour les multicouches de chitosane-ADNdb. Le substrat d'or est recouvert d'une couche d'alcane thiol pour la rendre hydrophobe. Une monocouche de lipides est ensuite déposée par la technique de Langmuir-Blodgett. La cellule échantillon en Teflon est disposée sur le substrat immergé et l'ensemble est fermé hermétiquement car la monocouche serait fortement déstabilisée par l'air. Une mesure de résonance des plasmons de surface est effectuée sur la monocouche de lipides. Les fragments de cadhérines sont ensuite injectés et l'adsorption peut être suivie par mesure cinétique. Lorsque le signal est stabilisé, une mesure angulaire de la résonance des plasmons de surface est effectuée afin de déterminer la masse adsorbée par un ajustement d'une courbe calculée par les équations décrites dans le Chapitre I et plus haut dans ce chapitre.

L'appareil SPR est actuellement repris en charge par R. Calemczuk. Plusieurs projets du laboratoire nécessitent la caractérisation d'échantillons et l'étude de l'adsorption de molécules sur des surfaces solides et des interactions entre molécules par SPR. En collaboration avec A. Buhot de notre laboratoire, R. Calemczuk se propose d'étudier l'hybridation d'oligonucléotides. Pour cela, des oligonucléotides simples brins seront immobilisés sur un substrat solide recouvert d'or par électropolymérisation d'un mélange de polypyrrole et d'oligonucléotides pyrrolés. L'hybridation de ces oligonucléotides avec des brins complémentaires sera suivie par mesures de la résonance des plasmons de surface cinétique

et angulaire. Pour étudier l'hybridation en fonction de la température, un système de régulation de la température sera ajouté au dispositif expérimental. L'hybridation des oligonucléotides sera également étudiée en fonction d'un champ électrique extérieur. Les interactions entre molécules d'ADN chargées négativement ont lieu en solution grâce à l'écrantage des charges par des cations présents en solution. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, il sera intéressant d'appliquer un champ électrique qui pourrait modifier ces interactions.

Il est également envisagé de remplacer la photodiode par une caméra CCD pour obtenir une image de la surface de l'échantillon. Ce système serait développé afin d'étudier les inhomogénéités d'adsorption dues par exemple au substrat ou à l'injection.

Chapitre VI Conclusions et perspectives

Nous avons présenté dans ce manuscrit une étude de protéines d'adhérence cellulaire assemblées en monocouches à l'interface air-eau. Grâce cette technique d'immobilisation des protéines et aux méthodes expérimentales employées : la réflectivité des rayons X et l'ellipsométrie, nous avons pu obtenir des informations intéressantes sur le comportement des fragments extracellulaires de cadhérine au sein de la monocouche. Ces deux techniques sont complémentaires puisqu'elles permettent de déterminer à la fois la quantité de protéines contenues dans une monocouche et le profil de densité électronique suivant la normale à la monocouche. Nous avons ainsi pu montrer que les protéines étaient accessibles à d'autres molécules injectées en sous-phase. Les informations sur la densité des monocouches et sur la structure perpendiculaire à la surface nous ont permis de mettre en évidence le comportement des cadhérines en fonction de la concentration en calcium environnante.

Les couches de protéines immobilisées sous une monocouche lipidique constituent un système modèle, approprié à l'étude des protéines d'adhérence puisqu'elles permettent d'orienter les protéines d'une manière similaire à leur orientation à la surface d'une cellule, modélisant ainsi un environnement proche du contexte cellulaire. Elles présentent en ce sens un avantage sur les expériences *in vitro* en solution.

L'association de l'ellipsométrie et de la réflectivité X s'est révélée efficace pour l'étude de la formation de complexes protéiques à la surface de monocouches de lipides. Ces méthodes présentent l'avantage de permettre l'étude directe des molécules d'intérêt sans utiliser de marqueurs qui pourraient avoir un effet sur les interactions entre molécules.

Grâce à la simulation de courbes d'ellipsométrie angulaire, nous avons vérifié que les variations de l'angle ellipsométrique Δ ne sont pas linéaires avec l'augmentation d'épaisseur ou les changements d'indice de réfraction qui traduisent la densification de la monocouche. Ainsi, en contradiction avec de publications précédentes [Renault 1999, Vénien-Bryan 1998], les mesures ellipsométriques de l'angle Δ seul ne sont pas suffisantes pour décrire la cinétique des changements opérés au sein de la monocouche de protéine. Une conséquence de ce phénomène est que les contributions respectives du lipide et de la protéine dans la couche ne sont pas additives. La mesure simultanée des angles ψ et Δ est nécessaire à l'analyse des monocouches déposées à la surface de l'eau. Les mesures angulaires

permettent d'obtenir une évaluation des paramètres d'épaisseur et d'indice de réfraction dont le produit est utilisé pour calculer une densité massique de surface avec une incertitude de $0,5 \text{ mg/m}^2$. Cette information est essentielle pour l'étude des interactions entre protéines.

A partir des mesures de réflectivité X, nous avons obtenu des profils de densité électronique décrivant les couches constituées de lipide et de cadhérine avec une résolution expérimentale pouvant aller jusqu'à $0,7 \text{ nm}$. Grâce à la structure cristallographique du fragment extracellulaire de C-cadhérine, nous avons pu calculer la densité électronique moyenne de la protéine et convertir les profils de densité électronique en pourcentages de protéine et d'eau au sein de la monocouche. Par l'évaluation du rapport entre le nombre d'électrons et la masse des fragments de cadhérine étudiés, nous avons pu convertir les profils de densité électronique en profil de densité massique, et calculer la densité massique de surface. Ainsi, l'utilisation couplée de la réflectivité X et de l'ellipsométrie offrent la possibilité de calibrer les masses adsorbées apparentes évaluées à partir des mesures ellipsométrique. Celles-ci sont néanmoins biaisées par la difficulté de l'évaluation de l'incrément d'indice pour les protéines et par l'inadaptation de la relation de de Feijter au cas de la monocouche de lipides [de Feijter 1978].

Les deux programmes utilisés pour l'analyse des courbes de réflectivité X présentent des avantages complémentaires. En effet, le programme Parratt32 propose une description par entités chimiques de la couche [Parratt32]. Le programme *RefX* divise la monocouche en lamelles qui apportent une grande précision spatiale dans la direction perpendiculaire à la surface [Bardon 1999]. Des programmes d'analyse des courbes de réflectivité des rayons X et des neutrons tenant compte à la fois des groupements chimiques des molécules présentes dans les couches et proposant des profils détaillées sont développés actuellement [Vaknin 2001, Lösche 2002, Weygand 2002]. Lors de l'ajustement fait par ces méthodes, le nombre d'électrons dans une couche du profil de densité électronique est fixé selon la molécule à laquelle est attribuée la couche. Une telle modélisation permet par exemple de décrire l'organisation interne d'une monocouche lipidique [Schalke 2000]. Ces méthodes rassemblent ainsi les avantages des deux programmes que nous avons utilisés : une description du système physique en fonction des molécules qui le composent et une précision spatiale élevée dans la direction perpendiculaire à la couche.

La programme *RefX* a récemment été modifié afin que l'épaisseur des couches puisse être ajustée. Cette amélioration est très intéressante pour nos analyses car elle permettra de mieux décrire la partie lipidique des films lipo-protéiques. En effet, les épaisseurs des chaînes aliphatiques et des têtes polaires sont proches de la résolution expérimentale et donc de la taille des couches utilisées dans nos calculs. Un ajustement de la taille de ces couches pourrait décrire beaucoup mieux les lipides et par là, on s'attend à une meilleure adéquation globale de la courbe calculée à partir du modèle et de la courbe expérimentale.

L'objectif de ce travail était de développer des méthodes d'analyse des monocouches de protéines pouvant mettre en évidence des changements de densités et/ou d'épaisseurs au sein de la monocouche. Ces outils et les expériences préli-

minaires que nous avons effectuées ouvrent maintenant la voie à des expériences de biologie systématiques.

En ce qui concerne les monocouches à l'interface air-eau, des mesures supplémentaires sont nécessaires pour compléter l'étude des interactions entre cadhérines. Le rôle de la glycosylation des domaines extracellulaires de cadhérine n'est pas compris actuellement. Un fragment de VE-cadhérine glycosylé est actuellement produit dans l'équipe de D. Gulino et il serait intéressant de comparer d'une part les comportements des fragments de VE-cadhérine possédant ou non des polysaccharides et d'autre part ceux des fragments de VE- et de C-cadhérine.

L'étude de l'association entre des fragments de cadhérine composés d'un nombre variable de domaines extracellulaires est à poursuivre. Des constantes d'affinités entre les fragments de longueurs variables devront être déterminées au préalable. De plus, il sera nécessaire d'utiliser des mélanges de fragments dont un seul possède une étiquette polyhistidine. Après la formation de monocouches composées de complexes mixtes de fragments, l'effet d'un appauvrissement de la concentration en calcium environnante pourrait mettre en évidence la présence de complexes adhérents dépendants du calcium. L'étude par réflectivité X de telles couches pourrait alors permettre de déterminer les domaines impliqués dans les interactions. Des caractérisations biochimiques des mélanges de fragments sont nécessaires. Par exemple, l'analyse par électrophorèse de tels mélanges après réticulation chimique des complexes pourraient confirmer les hypothèses d'association entre fragments à nombre de domaines extracellulaires différents.

L'étude des interactions entre fragments de cadhérine mutés nous paraît également prometteuse. Les mutants sont des protéines dont un ou plusieurs acides aminés sont changés afin d'observer les effets de l'absence de l'acide aminé dans les interactions entre fragments. Cette méthode peut être appliquée au fragment extracellulaire entier de cadhérine. Elle présente ainsi l'avantage de ne pas perturber l'ensemble des interactions entre deux fragments de cadhérine, contrairement à la méthode utilisant des fragments courts.

Pour mettre en évidence les points de fixation des ions calcium le long les cadhérines, un ion lourd de même coordination que le calcium pourrait être mélangé avec les fragments de cadhérine, par exemple l'ion ytterbium. Des fragments de cadhérine contenant des méthionines sélénées pourraient être produits (un atome de sélénium remplaçant l'atome de soufre de la méthionine). Il serait intéressant d'effectuer des mesures de réflectivité X sur des monocouches composées de tels fragments près du seuil d'absorption des atomes de sélénium ou d'ytterbium afin d'obtenir des profils de densité électronique contrastés qui pourraient apporter une information complémentaire sur l'arrangement des domaines de cadhérine.

Un défaut des méthodes que nous avons décrites est de moyenniser l'information dans le plan de la monocouche. La cristallisation à deux dimensions des protéines apporte des informations sur la structure au sein de la monocouche. Dans sa thèse en cours, R. Al-Kurdi a élaboré des cristaux bidimensionnels du

fragment VE-EC1-4His. Ces cristaux sont étudiés par microscopie électronique à transmission en collaboration avec E. Hewat (I.B.S.). L'analyse de la structure des cristaux devrait résulter en une carte de projection de la densité électronique du fragment sur la surface de la monocouche. Elle permettrait de déterminer le mode d'assemblage des molécules de cadhérine à la surface des monocouches lipidiques. Elle apporterait ainsi des informations complémentaires à la réflectivité X sur les assemblages de cadhérines et les interactions en dimères ou en hexamères. L'inconvénient principal de cette technique est que les associations entre protéines observées dans le cristal n'est pas toujours celles représentatives des associations de protéines *in vivo*.

La cristallisation des protéines à deux dimensions est aujourd'hui une technique utilisée dans de nombreux laboratoires, mais elle reste un système modèle d'étude des étapes de formation des cristaux. Plusieurs thèses ont été consacrées à cette étude à Grenoble [Lenne 1998], [Courty 2001], ainsi que la thèse en cours de L. Drazeck qui cherche à élaborer des monocristaux bidimensionnels (Laboratoire Particules, Interfaces et Microfluidique, Grenoble).

Les monocouches formées sur surface solide apportent également des informations sur les interactions entre protéines. Pour étudier de telles couches, l'association des techniques de réflectivité X et d'ellipsométrie peut être remplacée par les techniques de réflectivité des neutrons et de résonance des plasmons de surface. L'appareil de mesure de la résonance des plasmons de surface permet de caractériser l'adsorption des monocouches formées directement sur un substrat solide recouvert d'une mince couche d'or. L'appareil commercial de mesure de la résonance des plasmons de surface Biacore (Pharmacia) est utilisé par de nombreux laboratoires de biologie. Le montage que nous avons réalisé propose une plus grande flexibilité d'utilisation, puisqu'il permet d'effectuer des mesures angulaires. Ces mesures offrent la possibilité d'évaluer l'épaisseur et l'indice de réfraction des couches, et d'obtenir des informations sur la densité de surface des monocouches protéines. La croissance de monocouches pourrait aussi être effectuée sur silicium pour permettre l'étude par réflectivité des neutrons. Un avantage des monocouches formées sur surface solide est en effet qu'elles ne nécessitent pas de transfert, au contraire des cristaux bi-dimensionnels de protéines observés par microscopie électronique. De plus, la manipulation des échantillons est facilitée et leur fragilité est moindre.

Dans le cadre de la collaboration avec D. Leckband concernant l'étude des interactions entre molécules d'adhérence, un projet d'expériences de réflectivité X et des neutrons est en cours. Il s'agit de déterminer un profil de densité perpendiculaire à la surface de monocouches de la protéine d'adhérence entre neurones nommée NCAM (voir Annexe 1). L'objectif est d'étudier les effets des chaînes polysaccharidiques sur les interactions entre ces molécules. Les monocouches seront élaborées à la surface de l'eau en ce qui concerne les expériences de réflectivité X et une étude préliminaire par ellipsométrie permettra d'étudier l'adsorption des molécules NCAM à une monocouche de lipides. Le groupe de D. Leckband maîtrise la technique de formation de monocouches sur une surface de mica qui sont utilisées pour étudier les interactions entre molécules par des mesures de force de surface. Des mesures de la résonance des plasmons de sur-

face sont utilisées pour caractériser les monocouches avant les mesures de force de surface. Cette technique sera employée pour l'élaboration d'échantillons destinés à être étudiés par réflectivité des neutrons.

Une collaboration avec le groupe d'E. Pebay-Peyroula (I.B.S.) est également en cours, impliquant notamment la thèse de V. Dubosclard. Ce projet concerne l'étude des protéines du complexe de la NADPH Oxydase [Grizot 2001]. Ce complexe est situé sur les membranes de neutrophiles. Il est impliqué dans la lutte contre les agents infectieux dans l'organisme par la production d'ions superoxydes qui déstabilisent les membranes bactériennes. Ce complexe est formé de deux protéines membranaires et de trois protéines cytoplasmiques. Dans son stage de DEA, A. Mitric s'est intéressée à deux protéines du complexe. Des fragments de ces protéines ont été produits avec une étiquette polyhistidine. La formation d'une monocouche de protéines sous une monocouche de lipides chélatant un ion nickel a été mise en évidence par ellipsométrie [Mitric 2001]. Ce thème de recherche est poursuivi actuellement par V. Dubosclard qui cherche à élaborer des cristaux tridimensionnels et bidimensionnels des différentes protéines du complexe. La caractérisation de l'adsorption de protéines sera suivie par ellipsométrie. L'assemblage de plusieurs protéines du complexe de la NADPH Oxydase pourra être étudiée également par ellipsométrie et par réflectivité des rayons X.

Annexe 1 cellulaire

Les molécules d'adhérence

Les cadhérines forment une des quatre familles de protéines d'adhérence cellulaire [Hunt1996]. Les autres molécules d'adhérence sont les suivantes :

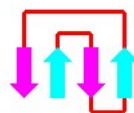
- La superfamille des immunoglobulines comprend une centaine de CAM. Cette famille doit son nom au fait que la partie extracellulaire de ces molécules est composée de plusieurs domaines d'immunoglobulines. L'équipe de D. Leckband s'intéresse par exemple à la NCAM qui forme des interactions homotypiques entre neurones ou hétérotypiques entre des neurones et des cellules musculaires.
- Les intégrines ont un rôle prépondérant dans les interactions entre les cellules et des protéines de la matrice extracellulaire, et entre cellules en se liant à des protéines de la superfamille des immunoglobulines.
- Les sélectines sont impliquées dans l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium. Elles engagent des interactions faibles qui sont par la suite relayées par les intégrines. A ce jour, trois sélectines sont connues: ce sont les sélectines E (endothélium), P (platelet) et L (leucocyte).

Annexe 2 de cadhérines

Structures cristallographiques

La topologie en "greek key"

La topologie en "greek key", est nommée ainsi en référence à un motif qui était commun sur les poteries grecques antiques. Cette structure est composée de quatre brins β . Trois brins β tête-bêche sont connectés au quatrième qui est adjacent au premier par une liaison plus longue [GreekKey].



topology of the Greek key

Figure 120 : Illustration du motif "greek key".

Fragments composés d'un domaine extracellulaire de cadhérine

Les complexes observés sont des associations observées dans le cristal et par conséquent peut-être très différentes des interactions *in vivo*.

Fragment EC1 de cadhérine



Figure 121 : Domaine EC1 : à gauche, E-cadherine [Overduin1995], à droite N-cadherine [Shapiro1995].

Fragments composés de deux domaines extracellulaires de cadhérine

Fragment EC1-2 de N-cadhérine

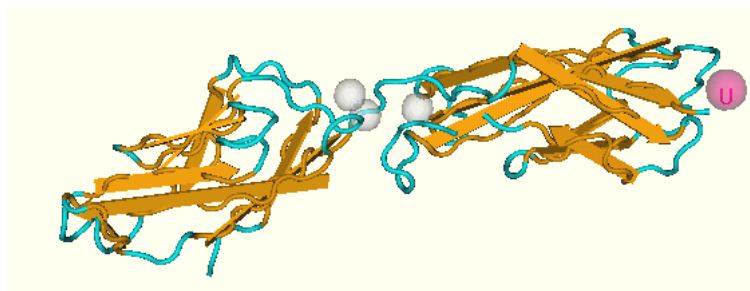


Figure 122 : Structure du fragment EC1-2 de N-cadhérine [Tamura1998].

Fragment EC1-2 de E-cadhérine de B. Nagar et al.

B. Nagar *et al.* ont cristallisé le fragment EC1-2 de E-cadhérine (cadhérine de l'Epithélium) en présence de calcium. Dans le cristal, deux fragments EC1-2 sont reliés au niveau de la zone de fixation des ions calcium en un dimères parallèle. La Figure 123 montre la structure obtenue par cristallographie, selon deux angles d'observation. Les extrémités C et N-terminales des fragments sont identifiées respectivement par les lettres A et B, et C et N.

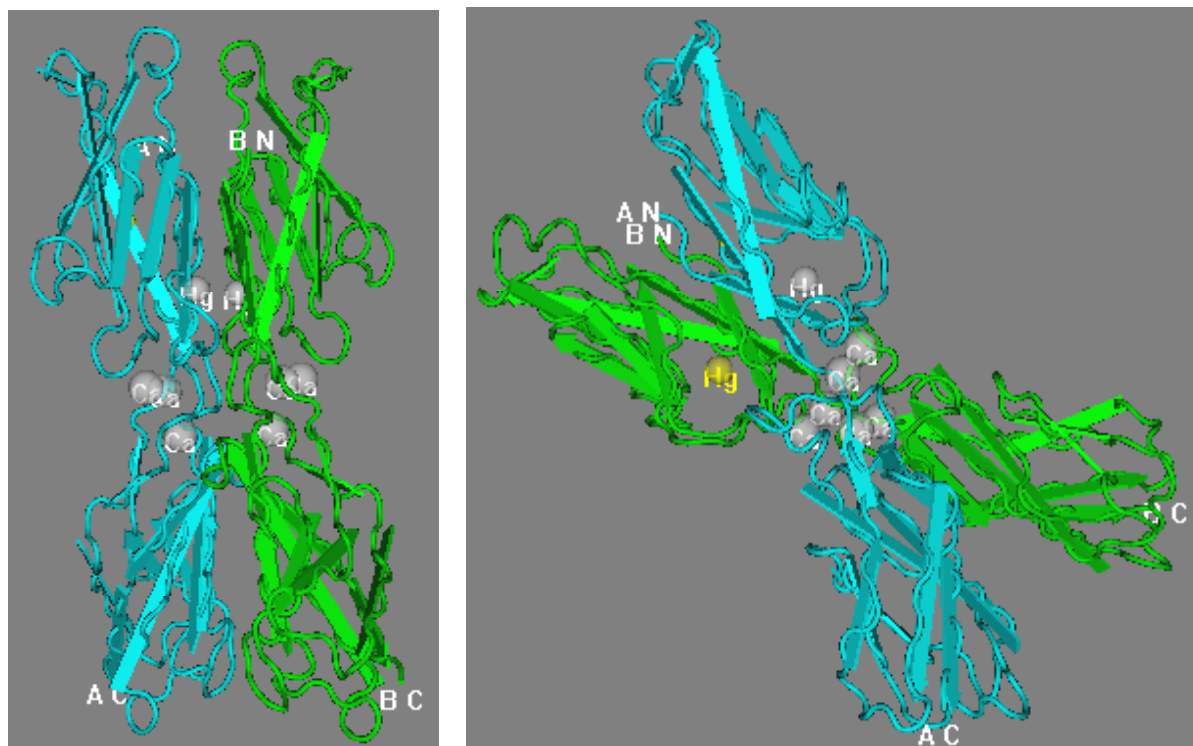


Figure 123 : Structure du fragment EC1-2 de E-cadhérine formant un dimère parallèle [Nagar1996]. Un atome de mercure a été utilisé pour la détermination de la phase.

Fragment EC1-2 de E-cadhérine de O. Pertz et al.

O. Pertz *et al.* ont cristallisé le fragment EC1-2 de E-cadhérine en présence de calcium [Pertz 1998]. Les auteurs observent une structure cristalline proche de celle obtenue par B. Nagar *et al.* [Nagar1996], dans laquelle les deux fragments EC1-2 sont reliés au niveau de la zone de fixation des ions calcium en un dimères parallèle. La Figure 123 montre la structure obtenue par cristallographie, selon deux angles d'observation. Les extrémités C et N-terminales des fragments sont identifiés respectivement par les lettres A et B, et C et N.

Les auteurs ont montré que les fragments EC1-5 de E-cadhérine forment des assemblages *cis* et *trans* via les domaines N-terminaux EC1 et EC2.

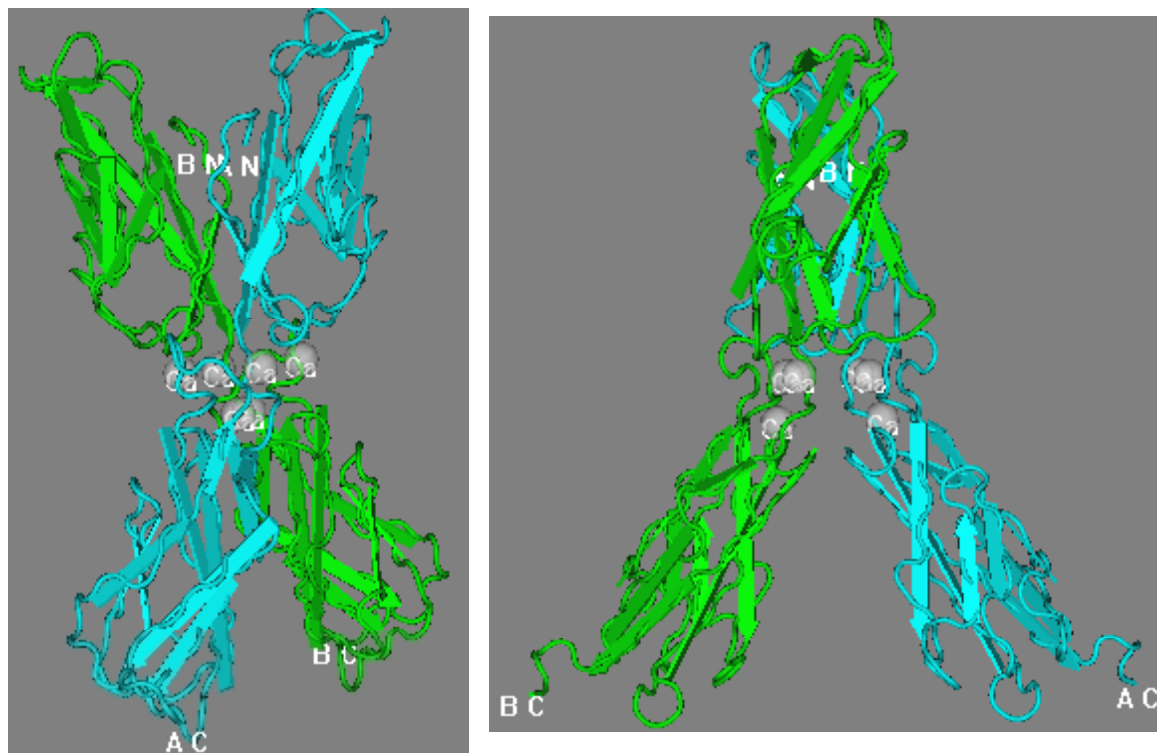


Figure 124 : Structure du fragment EC1-2 de E-cadhérine formant un dimère parallèle [Pertz1998].

Fragment composé des cinq domaines extracellulaires de cadhérine

T. Boggon *et al.* ont déterminé la structure cristallographique du fragment C-EC1-5His de C-cadhérine [Boggon 2002]. La Figure 125 montre trois fragments de C-cadhérine formant des associations *cis* (cadhérines claire et foncée) et *trans* (cadhérines claires ensembles). Les vues A et B sont des prises à 90° l'un de l'autre.

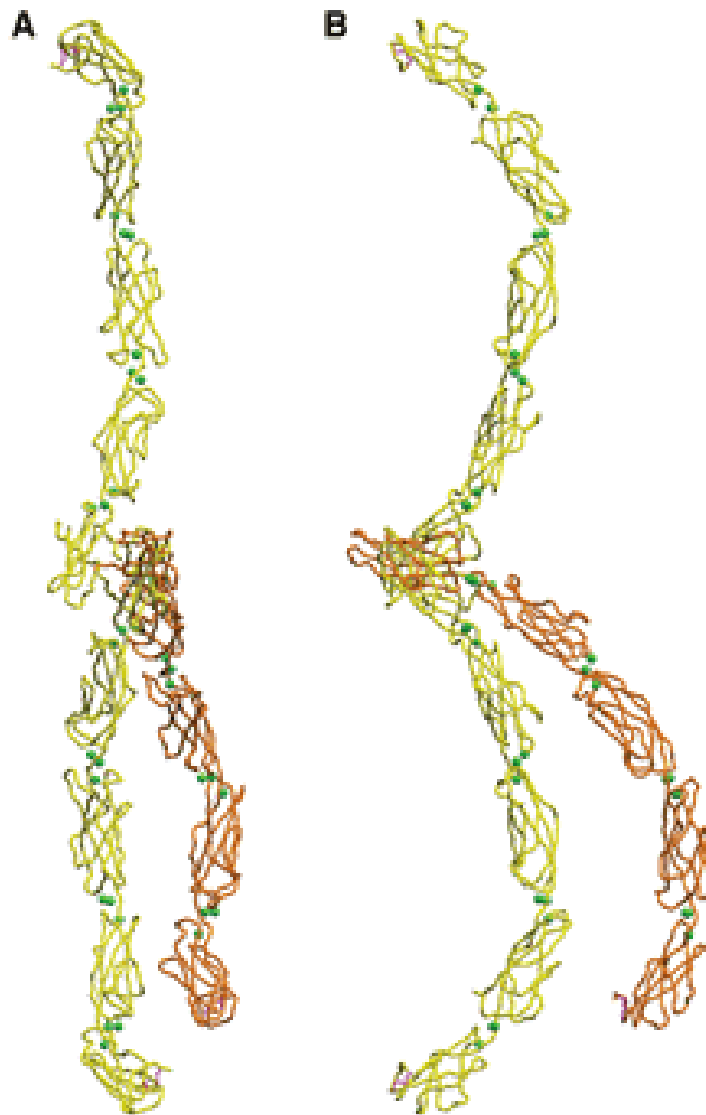


Figure 125 : Structure des cinq domaines extracellulaire de C-cadhérine indiquant des interactions *cis* et *trans* [Boggon 2002].

Annexe 3 matière

Interaction rayonnement-

Dispersion de l'indice de réfraction complexe

La Figure 126 présente l'exemple des variations des parties réelle et imaginaire de l'indice de réfraction complexe de l'eau en fonction de la fréquence de l'onde électromagnétique incidente : $\tilde{n}(\omega) = n(\omega) + i\kappa(\omega)$, dans des conditions normales de température et de pression [Jackson 1975].

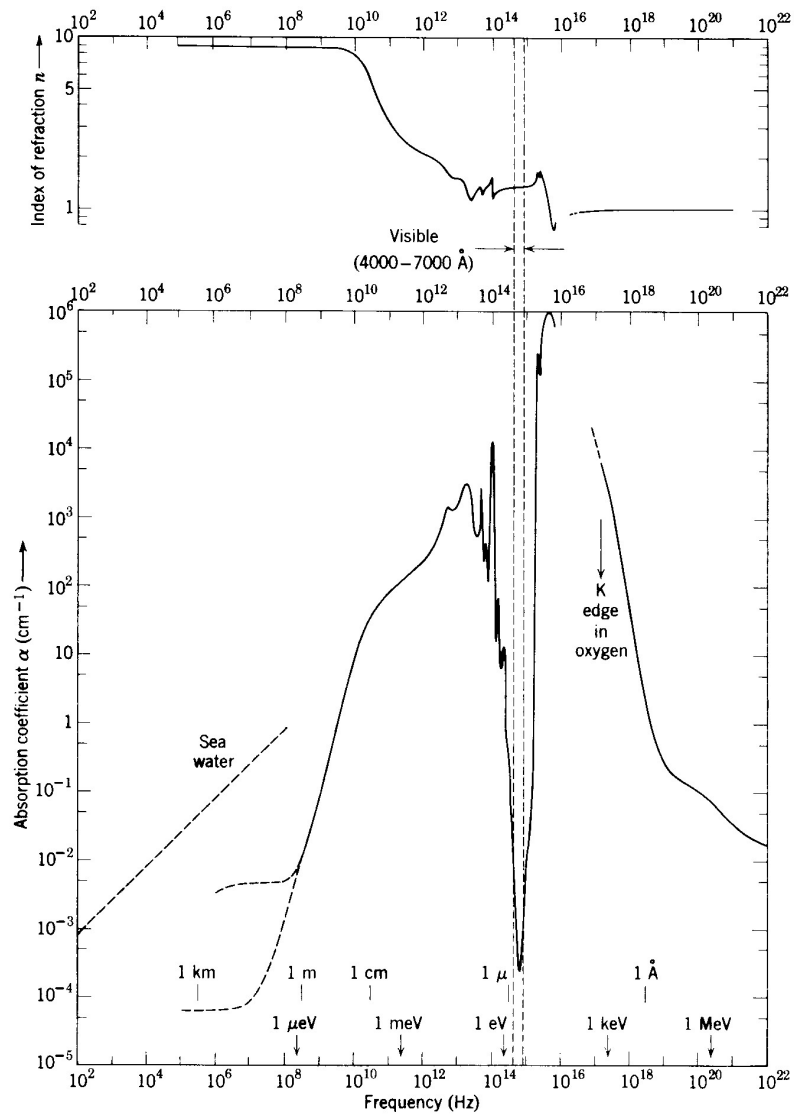


Figure 126 : Variations de l'indice de réfraction complexe en fonction de la fréquence : exemple de l'eau dans les C.N.T.P. En haut partie réelle n et en bas partie imaginaire $\alpha = \kappa \cdot \omega / c$ [Jackson 1975].

Réflexion totale et angle critique

La matière est définie par son indice de réfraction qui est le rapport de la vitesse de la lumière dans le vide et dans le matériau, $n=c/v$.

La loi de Snell-Descartes se déduit des conditions de propagation d'une onde électromagnétique à une interface. A l'interface entre deux milieux 1 et 2 d'indice respectif n_1 et n_2 , les angles d'incidence i_1 et de réfraction i_2 obéissent à la loi

$$n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2.$$

ou pour les angles complémentaires

$$n_1 \cos \theta_1 = n_2 \cos \theta_2.$$

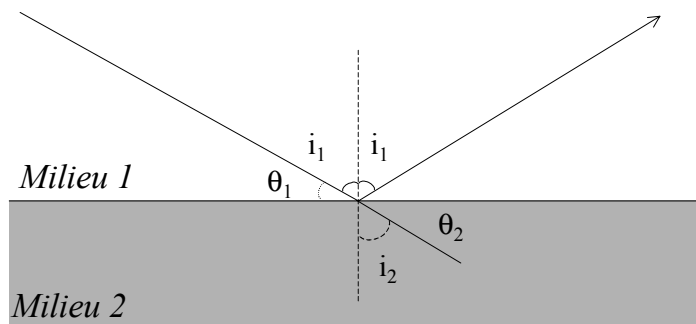


Figure 127 : Faisceau incident à l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction respectifs n_1 et n_2 .

Tout couple de matériau pour lesquels l'indice n_1 est supérieur à n_2 , il existe un angle d'incidence critique i_c au-dessus duquel il y a réflexion totale du faisceau incident sans réfraction dans le milieu: $\sin i_c = \frac{n_2}{n_1}$. Cette situation est appe-

lée réflexion totale. Toute l'énergie du champ incident est réfléchi et il n'y a pas de champ transmis. Il existe cependant une onde évanescente confinée à l'interface dont l'intensité décroît exponentiellement avec la distance à l'interface. Une profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans le matériau est définie comme la distance à laquelle l'amplitude du champ est diminuée par un facteur $1/e$. Elle s'écrit :

$$P = \frac{c}{n_2 \omega \sqrt{\frac{n_1}{n_2} \sin^2 i_1 - 1}}.$$

Polarisation de la lumière

La lumière est une onde électromagnétique transverse²⁵ qui est définie par une direction de propagation (\mathbf{k}) et des champs électrique (\mathbf{E}) et magnétique

²⁵ onde transverse : l'élongation des oscillations est perpendiculaire à la direction de propagation (cf. les vagues à la surface de l'eau).

(\mathbf{M})²⁶ (amplitudes et direction). Le plan d'incidence d'une onde électromagnétique par rapport à une interface est formé par la direction de propagation \mathbf{k} et la normale à la surface \mathbf{n} .

Nous avons dit plus haut que l'interaction entre l'onde électromagnétique et la matière dépend de l'angle d'incidence de l'onde. Il est donc essentiel de définir précisément les directions du champ électromagnétique, c'est-à-dire la polarisation de l'onde.

La polarisation de l'onde électromagnétique est définie par la direction de son champ électrique. On appelle TE (transverse électrique) ou s une onde dont le champ électrique est perpendiculaire au plan d'incidence. Dans le cas où le champ électrique est parallèle au plan d'incidence, l'onde est dite TM (transverse magnétique) ou p . De manière générale, une onde quelconque se décompose en une composante parallèle p et une composante perpendiculaire s . Elle sera :

- linéairement polarisée s (resp. p) si, au cours du temps, le champ électrique reste perpendiculaire (resp. parallèle) au plan d'incidence. Par extension, elle peut être linéairement polarisée dans une direction quelconque si le champ électrique fait un angle constant avec la direction normale au plan.
- polarisée elliptiquement lorsqu'il y a une différence de phase $\phi = \delta_s - \delta_p$ et d'amplitude entre les composantes s et p . Elle sera dite droite (resp. gauche) lorsque les composantes s et p du champ électrique précèdent autour de la direction de propagation dans le sens (resp. inverse) des aiguilles d'une montre lorsque l'on regarde dans la direction opposée à la propagation

$$\vec{E}(z, t) = E_x \cos(\omega t - k.z + \delta_x) \hat{x} + E_y \cos(\omega t - k.z + \delta_y) \hat{y}$$

Une onde polarisée circulairement est un cas limite de polarisation elliptique où les composantes s et p ont même amplitude et précèdent en quadrature de phase c'est-à-dire $\phi = \pi/2$ (une des composantes p et s est maximale quand l'autre est minimale).

Une onde polarisée linéairement est le cas limite où les composantes ont des amplitudes différentes et précèdent en phase c'est-à-dire $\phi = 0$ ou en opposition de phase (les composantes p et s ont leurs maxima et minima en même temps). Ainsi, une onde polarisée linéairement s ou p n'interagit pas de la même manière avec la matière.

²⁶ les champs électrique et magnétique sont par définition perpendiculaires entre eux et à la direction de propagation.

Annexe 4 Estimation de la masse de protéines adsorbée dans une monocouche

Equation de Lorentz-Lorenz

L'équation de Lorentz-Lorenz modifiée est utilisée pour évaluer la masse Γ de protéine adsorbée sur une surface liquide ou solide [Bruhat 1965]. Deux données sont nécessaires au calcul de la masse par cette équation : r , qui est le rapport de la réfractivité molaire sur la masse molaire de la protéine et v le volume partiel spécifique de la protéine. L'équation de Lorentz-Lorenz modifiée s'écrit :

$$\Gamma = 3d \frac{n^2 - n_s^2}{(n^2 + 2) \cdot (r(n_s^2 + 2) - v(n_s^2 - 1))}$$

où n_s est l'indice de réfraction du substrat, d est l'épaisseur de la couche déposée, n son indice de réfraction, r sa réfractivité molaire et v son volume partiel spécifique.

Le Tableau 21 présente quelques résultats obtenus par cette méthode ainsi que les données de référence de réfractivité molaire et de volume partiel spécifique des protéines étudiées.

Cette méthode est comparable à celle de de Feijter *et al.* [de Feijter 1978] puisqu'elle évalue la masse de protéines adsorbée à partir de l'indice de réfraction et de l'épaisseur de la couche de protéines et de l'indice du substrat. Elle ne permet donc pas de tenir compte de la contribution des lipides. De plus, il est nécessaire de connaître la réfractivité molaire et le volume partiel spécifique de la protéine. Nous lui avons préféré la méthode de Feijter *et al.* qui ne nécessite qu'un seul paramètre, l'incrément d'indice.

Références	Molécule	Γ (mg/m ²) à saturation	Données de référence
[Cuyppers 1983] Laser He-Ne Verre chromé	Prothrombine	3	r=0,236 ml/g v=0,700 ml/g
[Andree 1990] Silicium	DOPS	1,95 ± 0,25	r=0,254 ml/g v=0,71 ml/g
	DOPS :DOPC (1:99)	2,43 ± 0,07	
	Bicouche DOPS :DOPC (1 :4)	4	
	Annexine V	2,2 ²⁷	
[Höök 2001] $\lambda=401,5$ nm Verre doré	protéine d'adhérence Mefp-1	1,35 ± 0,15	r=0,249 ml/g v=0,742 ml/g

Tableau 21 : Evaluation de Γ : l'équation de Lorentz-Lorenz modifiée.

Densités massiques surfaciques de cristaux bidimensionnels de protéines

L'ordre grandeur des densités de surface des monocouches de protéines peut être estimé grâce à l'exemple des cristaux bi-dimensionnels de protéines. La densité surfacique des cristaux bidimensionnels de protéines peut être calculée par la relation : $\Gamma = \frac{nm_p}{A}$, où n est le nombre de protéines dans la maille, m_p la masse de la protéine, et A l'aire de la maille cristallographique. Elle correspond à la densité de protéine dans le cristal, donc à une densité massique de surface maximale de la monocouche, puisque la surface n'est pas entièrement recouverte de cristaux.

Le **Erreur! Source du renvoi introuvable.** indique les densités massiques surfaciques Γ de plusieurs cristaux bi-dimensionnels de protéines. Suivant les données consignées dans les articles, il est possible de calculer la masse adsorbée par unité de surface en tenant compte des lipides si les auteurs indiquent l'aire par lipides ou la pression de surface à laquelle ils ont obtenus les cristaux. La densité massique surfacique varie de 1,33 mg/m² à 12,50 mg/m².

Protéine Lipides	Maille (Å)	Protéines /maille	Γ (mg/m²)	Auteurs
Sticholysine II 19,2 kDa PC	98x196 $\gamma=89,1$	8	1,3	Martín- Benito 2000
Streptavidine 60 kDa Biotin-LC-DPPE	84x84 $\gamma=90^\circ$	2	2,9	Lenne 1998
HIV reverse trans- criptase 138 kDa Ni-NTA-DOPE:PE (1:10)	160x160 $\gamma=120^\circ$	3	3,1	Kubalek 1994
HupR 53,843 Da Ni-NTA-DOGA	111x111 $\gamma=120^\circ$	6	4,9	Lenne 1998, Courty 2002
Prososome de cellules HeLa 720 kDa (sans lipides)	170x120 $\gamma=113^\circ$	1	6,4	Perkins 1994
Protéine du capsid du virus de la leucémie murine de Moloney 35 kDa Ni-DHGN:PC ~ de (1:100) à (1:50)	79,2x137,5 $\gamma=89,7^\circ$	12	6,46 (eau incluse)	Barklis 1997
Protéine du capsid du virus HIV-1 59,23 kDa Ni-DHGN:PC (1:4) (w:w)	74,8x126,2 $\gamma=89,3^\circ$	12	12,50	Barklis 1998

Tableau 22 : Calcul de la densité massique de surface pour des exemples de cristaux bidimensionnels de protéines. Selon les exemples, le calcul de Γ peut inclure la contribution des lipides.

Annexe 5 Autres molécules étudiées

Protéine HupR et lipides utilisés pour sa cristallisation bidimensionnelle

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec S. Courty de l'I.B.S. et C. Vénien-Bryan du Laboratory of Molecular Biophysics, à l'Université d'Oxford.

La protéine HupR appartient à une famille de protéines fabriquées par les cellules procaryotes et capables de transmettre des signaux entre cellules. Ces protéines sont nécessaires pour détecter des changements de l'environnement cellulaire. Elles permettent aux cellules de survivre dans des milieux très divers en déclenchant des réponses adaptées. La protéine HupR est une protéine de la bactérie *Rhodobacter capsulatus*. Elle fait partie d'un système de régulation à deux composants, comprenant un récepteur et un régulateur de réponse. Elle est un régulateur de transcription de la synthèse de l'hydrogénase [NiFe]. L'hydrogénase permet à la bactérie de vivre dans un milieu contenant du dihydrogène et de l'utiliser en tant que donneur d'électrons. La structure primaire de la protéine HupR est connue, mais sa structure tridimensionnelle n'est pas encore résolue actuellement. La cristallisation bidimensionnelle constitue dans ce cas une alternative. Des expériences de microscopie électronique ont ainsi montré que la protéine HupR est un dimère et une carte de projection de sa densité a pu être construite avec une résolution de 9 Å par C. Vénien-Bryan [Vénien-Bryan 1997, Courty 2002]. Sa reconstruction tridimensionnelle est en cours à partir des données bidimensionnelles. Les conditions de cristallisation bidimensionnelle sont donc bien connues. Plusieurs lipides ont permis l'élaboration de cristaux bidimensionnels de la protéine HupR [Vénien-Bryan 1997, Courty 2001]. Les lipides que nous avons utilisés sont des lipides branchés dont la structure chimique est décrite sur la Figure 128.

La protéine HupR est préparée dans une solution tampon composée de 20 mM Tris-HCl et de 0,3 M NaCl, à pH 8. Son point isoélectrique est égal à pH 5,5, la molécule est donc chargée négativement à ce pH.

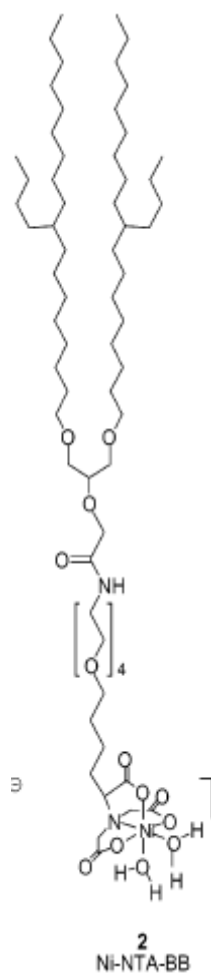


Figure 128 : Structure du lipide branché Ni-NTA-BB [Courty 2002].

Pyrrole

Le polypyrrole est un polymère semi-conducteur, facilement élaboré par électropolymérisation.

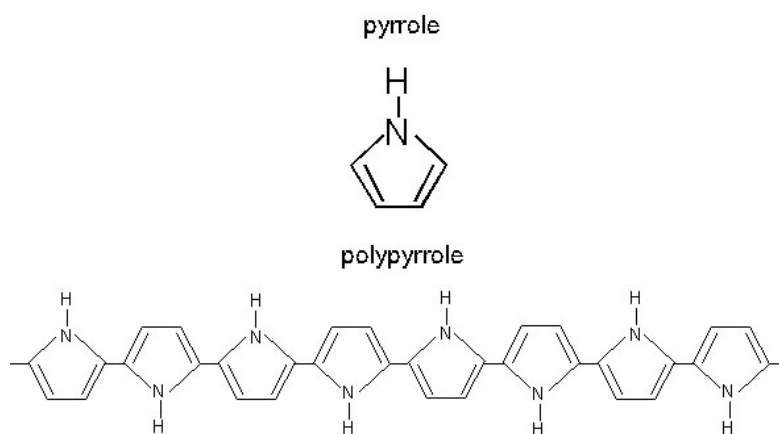


Figure 129 : Structure du pyrrole et schéma d'un polypyrrole.

Publications

[Courty 2002] Courty S., Lebeau L., Martel L., Lenne P.-F., Balavoine F., Dischert W., Konovalov O., Mioskowski C., Legrand J.-F., Vénien-Bryan C. Two-Dimensional Crystallization of a Histidine-Tagged Protein on Monolayers of Fluidity-Enhanced Ni²⁺-Chelating Lipids . *Langmuir*, **18**, 9502-9512 (2002).

[Martel 2002] Martel L., Johnson C., Boutet S., Al-Kurdi R., Konovalov O., Robinson I., Leckband D., Legrand J.-F. X-ray reflectivity investigations of two-dimensional assemblies of C-cadherins: First steps in structural and functional studies. *J. Phys. IV*. **12**, 365-377 (2002).

Bibliographie

[Abélès 1950] Abélès, F. Recherches sur la propagation des ondes électromagnétiques sinusoïdales dans les milieux stratifiés. Application aux couches minces. *Ann. Phys.* **5**, 596-640 et 706-782. (1950).

[Acher 1989] Acher O., Bigan E., Drévilion B. Improvements of phase modulated ellipsometry. *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 65-77 (1989).

[Alberts 1994] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Waston, J.D. Molecular Biology of the Cell. 3rd Edition. *Garland publishing*. (1994).

[Allinger 1977] Allinger N. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. Am. Chem. Soc.* **99**(25), 8127-8134. (1977).

[Als-Nielsen 1991] Als-Nielsen, J. X-ray reflectivity studies of liquid surfaces. In "Handbook on Synchrotron Radiation" (G. Brown and D.E. Moncton Ed.) *Elsevier North-Holland, Amsterdam*. **3**, 471-503 (1991).

[Als-Nielsen 1994] Als-Nielsen, J., Jacquemain, D., Kjaer, K., Lahav, M., Lev-eiller, F., Leiserowitz, L. Principles and applications of grazing incidence x-ray and neutron scattering from ordered molecular monolayers at the air-water interface. *Phys. Rep.* **246**, 251-313 (1994).

[Andersson 1998] Andersson, K.M., Hovmöller, S. The average atomic volume and density of proteins. *Z. Kristallogr.* **213**, 369-373. (1998)

[Andree 1990] Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem.* **265**,4923-8 (1990).

[Angst 2001] Angst, B. D., Marcozzi, C., Magee, A. I. The cadherin superfamily. *J. Cell Sci.* **114**, 625-626 (2001).

[Azzam 1977] Azzam, R. M. A. and Bashara, N. M. Ellipsometry and polarized light. *North-Holland publishing company*. (1977).

[Bardon 1999] Bardon S., Ober R., Valignat M. P., Vandenbrouck F., Cazabat A. M., Daillant J. Organization of cyanobiphenyl liquid crystal molecules in prewetting films spreading on silicon wafers. *Phys Rev E*, **59**, 6808-6818 (1999).

[Barklis 1997] Barklis E., McDermott J., Wilkens S., Schabtach E., Schmid M. F., Fuller S., Karanjia S., Love Z., Jones R., Rui Y., Zhao X., Thompson D. Structural analysis of membrane-bound retrovirus capsid proteins. *EMBO J.* **16** (6), 1199-1213 (1997).

[Barklis 1998] Barklis E., McDermott J., Wilkens S., Fuller S., Thompson D. Organization of HIV-1 capsid proteins on a lipid monolayer. *J. Biol. Chem.* **273** (13), 7177-7180 (1998).

[Behrens 1999] Behrens, J. Cadherin/catenin-mediated signal transduction. In "Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins", (Kreis and Vale Ed.). *Oxford University Press, New-York*. (1999).

[Berge 1998] Berge, B. Lenne, P.-F., Renault A. X-ray grazing incidence diffraction on monolayers at the surface of water. *Curr. Op. Coll. Inter. Sci.* **3**, 321-326, (1998).

[Bershadsky 1999] Bershadsky, A., Geiger, B. Introduction. In "Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins", (Kreis and Vale Ed.). *Oxford University Press, New-York*. (1999)

[Biacore 1] Disponible sur <http://www.biacore.com> (consulté le 20 février 2003).

[Biacore 2] Microfluidic flow system Disponible sur <http://www.biacore.com/technology/microfluidic.lasso> (consulté le 20 février 2003).

[Bibert 2002] Bibert S., Jaquinod M., Concord E., Ebel C., Hewat E., Vanbelle C., Legrand P., Weidenhaupt M., Vernet T., Gulino-Debrac D. Synergy between extracellular modules of vascular endothelial cadherin promotes homotypic hexameric interactions. *J Biol Chem.* **277** (15), 12790-12801. (2002).

[BioCell 2002] Cours de biologie cellulaire 2002. Carnegie Mellon University, Pittsburgh, E.-U. Disponible sur <http://www.bio.cmu.edu/Courses/03240> (consulté le 20 février 2003).

[Boggon 2002] Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., Shapiro, L. Structure of the C-cadherin ectodomains and implications for the mechanism of cell adhesion. *J. Phys. Chem.* **52**, 125 (2002).

[Born Wolf 1985] Born, M., Wolf, E., Principles of Optics, 5th Ed. *Pergamon Press* (1985).

[Braslau 1988] Braslau, A., Pershan, P. S., Swislow, G., Ocko, B. M., Als-Nielsen, J. Capillary waves on the surface of simple liquids measured by x-ray reflectivity. *Phys. Rev. A.* **38**, 2457-2470 (1988).

[Bruhat 1965] Bruhat G. Optique. In "Cours de physique générale", 6^{eme} édition. *Masson et Cie Ed.* (1965).

[Calvert 1997] Calvert T. L., Leckband, D. E. Two-dimensional protein crystallization at solid-liquid interfaces. *Langmuir.* **13** (25), 6737-6745 (1997).

[CCP4 1971] Collaborative Computational Project 4, *Acta Cryst.* **D50**, 760-763 (1994).

[Chappuis-Flament 2001] Chappuis-Flament, S., Wong, E. Hicks, L. D., Kay, C. M., Gumbiner, B. M. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J. Cell Biol.* **154** (1), 231-243 (2001).

[Corn 2002] Corn, R. M. Programme de calcul de la résonance des plasmons de surface. Disponible sur <http://corninfo.chem.wisc.edu/> (consulté le 27 septembre 2002)

[Courty 2001] Courty, S. Solides bidimensionnels à l'interface air-eau : mesures mécaniques et optiques. *Thèse de doctorat de physique*. Université Joseph Fourier, Grenoble 1 (2001).

[Courty 2002] Courty S., Lebeau L., Martel L., Lenne P.-F., Balavoine F., Dischert W., Konovalov O., Mioskowski C., Legrand J.-F., Vénien-Bryan C. Two-

Dimensional Crystallization of a Histidine-Tagged Protein on Monolayers of Fluidity-Enhanced Ni²⁺-Chelating Lipids. *Langmuir*, **18**, 9502-9512 (2002).

[Cuypers 1983] Cuypers P., Corsel J. W., Jansen M. P., Kop J. M. M., Hermens, W. T., Hemker H. C. The adsorption of prothrombin to phosphatidylserine multilayers quantitated by ellipsometry. *J Biol Chem.* **258**, 2426-2431 (1983).

[CXRO] Center for X-Ray Optics. X-Ray Attenuation Length. *Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL)*. Disponible sur <http://www-cxro.lbl.gov>. (consulté le 15 octobre 2002).

[Daillant 1996] Daillant J., Quinn K., Gourier C., Rieutord F. Grazing incidence surface scattering of X-rays. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **92** (4) 505-513 (1996).

[Davies 1996] Davies J., Faulkner I. Surface plasmon resonance – theory and experimental considerations. In "Surface analytical techniques". *CRC Press*. (1996).

[de Feijter 1978] de Feijter, J. A., Benjamins, J., Veer, F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* **17**, 1759-1772 (1978).

[Dietrich 1995] Dietrich C., Schmitt L., Tampé R. Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self-assembled lipid interfaces using a novel class of chelator lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 9014-9018, (1995).

[Dietrich 1996] Dietrich C., Boscheinen O., Scharf K.-D., Schmitt L., Tampé R. Functional immobilization of a DNA-binding protein at a membrane interface via histidine tag and synthetic chelator lipids. *Biochemistry.* **35**, 1100-1105, (1996).

[Dorn 1998] Dorn I., Neumaier K., Tampé R. Molecular recognition of histidine-tagged molecules by metal-chelating lipids monitored by fluorescence energy transfer and correlation spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2753-2763, (1998).

[Drude 1891] Drude P. Über Oberflächenschichten. II. Teil. *Ann. Phys. Chem.* **36**, 865-897 (1891).

[Ducharme 1990] Ducharme D., Max J.J., Salesse C., Leblanc R.M. Ellipsometric study of the physical states of phosphatidylcholines at the air-water interface. *J. Phys. Chem.* **94**(5), 1925-1932 (1990).

[Elwing 1998] Elwing, H. Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterials.* **19**, 397406 (1998).

[EMAtlas 2002] Elektronenmikroskopischer Atlas im Internet. Disponible sur <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAtlas.html> (consulté le 09 octobre 2002).

[Fukazawa 1993] Fukazawa T., Sano M., Yoshida Y., Sakayanagi N. A novel method for stabilizing the photoelastic modulator used in a polarization modulated spectroscopic ellipsometer. *Thin Solid Films.* **234**, 390-394 (1993).

[Gambut 1996] Gambut L., Chauvet J.-P., Garcia C., Berge B., Renault A., Riviere S., Meunier J., Collet A., Ellipsometry, Brewster Angle Microscopy, and Thermodynamic Studies of Monomolecular Films of Cryptophanes at the Air-Water Interface. *Langmuir*, **12** (22), 5407-5412 (1996).

[Geyer 1999] Geyer H, Geyer R, Odenthal-Schnittler M, Schnittler HJ. Characterization of human vascular endothelial cadherin glycans. *Glycobiology*. **9** (9), 915-925 (1999).

[Gibaud 1999] Gibaud, A. Specular reflectivity from smooth and rough surfaces. In "X-ray and neutron reflectivity : principles and applications" (J. Daillant and A. Gibaud Ed.) *Springer* (1999).

[Gidalevitz 1999] Gidalevitz D., Huang Z., Rice S. A. Protein folding at the air-water interface studied with X-ray reflectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2608-2611, (1999).

[Ginsberg 1991] Ginsberg D, DeSimone D, Geiger B. Expression of a novel cadherin (EP-cadherin) in unfertilized eggs and early *Xenopus* embryos. *Development*. **111**(2), 315-25. (1991).

[Goastes 1999] Goastes S. R., Schofield D. A., Bain C. D. A. Study of Nonionic Surfactants at the Air-Water Interface by Sum-Frequency Spectroscopy and Ellipsometry *Langmuir*. **15**(4), 1400-1409, (1999).

[Gory-Fauré 1999] Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, Huber P. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*. **126**(10), 2093-2102. (1999).

[Gourier 1997] Gourier C., Daillant J., Braslau A., Alba M., Quinn K., Luzet D., Blot C., Chatenay D., Grübel G., Legrand J.-F., Vignaud G. Bending Energy of Amphiphilic Films at the Nanometer Scale. *Phys. Rev. Lett.* **78** (16), 3157-3160 (1997).

[GreekKey] Principles of Protein Structure Using the Internet. Disponible sur http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section10/all_beta.html (consulté le 11 octobre 2002).

[Green 2000] Green R.J., Frazier R.A., Shakesheff K.M., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*. **21** (18), 1823-1835 (2000).

[Grizot 2001] Grizot S, Grandvaux N, Fieschi F, Faure J, Massenet C, Andrieu JP, Fuchs A, Vignais PV, Timmins PA, Dagher MC, Pebay-Peyroula E. Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox. *Biochemistry*. **40**(10), 3127-33 (2001)

[Guédon 2000a] Guédon, Ph. Etude de systèmes optiques pour l'analyse directe, en temps réel et en parallèle, d'interactions biomoléculaires. *Thèse de doctorat d'optique*. Université Paris 6. (2000).

[Guédon 2000b] Guédon, Ph., Livache T., Martin F., Lesbire F., Roget A., Bidan G., Levy Y. Characterization and optimisation of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* **72**, 6003-6009, (2000).

[Gulino 1998] Gulino D, Delachanal E, Concord E, Genoux Y, Morand B, Valiron MO, Sulpice E, Scaife R, Alemany M, Vernet T. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J Biol Chem*. **273** (45), 29786-29793 (1998).

[Gumbiner 1996] Gumbiner, B. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. **84**, 345-357 (1996).

- [Gumbiner 2000] Gumbiner, B. Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell Biol.* **142** (3), 399-403 (2000).
- [Haas 1995] Haas, H., Brezesinski, G., Mohwald, H. X-ray diffraction of a protein crystal anchored at the air/water interface. *Biophys. J.* **6n 8**, 312-314. (1995).
- [Hahn Berg 2001] Hahn Berg I. C., Muller D., Arnebrant T., Malmstem M. Ellipsometry and TIRF studies of enzymatic degradation of interfacial proteinaceous layers. *Langmuir* **17**, 1641-1652, (2001).
- [Handbook 1960] Handbook of biochemistry. (H.A. Sober Ed.) *The chemical Rubber Co., Cleveland.* (1960)
- [Handbook 1995] CRC Handbook of chemistry and physics. (D. R. Lide Ed.) *CRC Press Inc.* (1995)
- [Hansen 1968] Hansen, W. Electric fields produced by the propagation of plane coherent electromagnetic radiation in a stratified medium. *J. Opt. Soc. Am.* **58**, 380-390 (1968)
- [Hemming 1995] Hemming SA, Bochkarev A, Darst SA, Kornberg RD, Ala P, Yang DS, Edwards AM. The mechanism of protein crystal growth from lipid layers. *J Mol Biol.* **246**(2), 308-316. (1995).
- [Homola 1999] Homola J., Sinclair S. Y., Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors : review. *Sensors and Actuators B* **54**, 3-15, (1999).
- [Höök 2001] Höök F., Kasemo B., Nylander T., Fant C., Sott K., Elwing H. Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Anal Chem.* **73**(24), 5796-804, (2001).
- [Hunt 1996] Hunt, S.W. 3rd, Harris, E.S., Kellermann, S.A., Shimizu, Y. T-lymphocyte interactions with endothelium and extracellular matrix. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **7** (1), 59-86 (1996).
- [ID10B] Ligne de lumière ID10B à l'ESRF, Grenoble. Disponible sur http://www.esrf.fr/exp_facilities/ID10B/handbook/ (consulté le 3 octobre 2002).
- [Iino 2001] Iino R., Koyama I., Kusumi A. Single Molecule Imaging of Green Fluorescent Proteins in Living Cells: E-Cadherin Forms Oligomers on the Free Cell Surface *Biophys. J.* **80**: 2667-2677 (2001).
- [Jackson 1975] Jackson, J, D. Classical Electrodynamics. 2nd edition. *Wiley, New York.* (1975).
- [Jellison 1993] Jellison Jr., G. E. Data analysis for spectroscopic ellipsometry. *Thin Solid Films.* **234**, 416-422. (1993).
- [Jobin-Yvon 1995] Manuel d'utilisation de l'ellipsomètre à modulation de phase UVISEL, Jobin-Yvon, Instruments S.A. (1995).
- [Jönsson 1985] Jönsson U., Malmqvist M., Rönnerberg I. Adsorption of immunoglobulin, protein A, fibronectin in the submonolayer region evaluated by a combined study of ellipsometry and radiotracer techniques. *J. Coll. Interf. Sci.* **103**(2), 360-372 (1985).
- [Kjaer 1987] Kjaer K., Als-Nielsen J., Helm, C. A., Laxhuber, L. A., Möhwald H. Ordering in Lipid Monolayers Studied by Synchrotron X-Ray Diffraction and Fluorescence Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **58**, 2224-2227 (1987).

[Koch 1997] Koch AW, Pokutta S, Lustig A, Engel J. Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry*. **36**(25), 7697-7705. (1997).

[Konovalov 2002] Konovalov O, Myagkov I, Struth B, Lohner K. Lipid discrimination in phospholipid monolayers by the antimicrobial frog skin peptide PGLa. A synchrotron X-ray grazing incidence and reflectivity study. *Eur Biophys J*. **31** (6), 428-37. (2002).

[Kubalek 1994] Kubalek EW, Le Grice SF, Brown PO. Two-dimensional crystallization of histidine-tagged, HIV-1 reverse transcriptase promoted by a novel nickel-chelating lipid. *J Struct Biol* **113**(2), 117-23 (1994)

[Lavrik 2000] Lavrik, N., Leckband, D., E. Optical and Direct Force Measurements of the Interactions between Monolayers of Aromatic Macrocycles on Surfactant Monolayers. *Langmuir*. **16**(4), 1842-1851. (2000).

[Leckband 1993] Leckband D. E., Israelachvili J. Molecular basis of protein function as determined by direct force measurements. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 450-459 (1993).

[Leckband 1995] Leckband, D. E. The surface force apparatus – a tool for probing molecular protein interactions. *Nature*. **376**, 617-618 (1995).

[Leckband 2000] Leckband, D. E., Sivasankar, S. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol*. **12** (5), 587-592. .2000.

[Leckband 2001] Leckband, D. E. Force as a probe of membrane protein structure and function. *Curr Opin Struct Biol*. **11** (4), 433-439. (2001).

[Leckband 2002] Leckband, D. E. The structure of the C-cad ectodomain resolved. *Structure*. **10**, 1-20 (2002).

[Lee 1989] Lee C., Kwak J. Bard A. J. Polymer Films On Electrodes. 24. Ellipsometric Study Of The Electrochemical Redox Processes Of A Polypyrrole Film On A Platinum Electrode. *J. Electrochem. Soc.* **136** (12), 3720-3724 (1989).

[Legrand 2000] Legrand, P. Etude des interactions homotypiques de la VE-cadhérine humaine: approches biochimiques et structurales. *Thèse de doctorat de physique, discipline : cristallographie des macromolécules biologiques*. Université Joseph Fourier, Grenoble 1. (2000)

[Legrand 2001] Legrand P, Bibert S, Jaquinod M, Ebel C, Hewat E, Vincent F, Vanbelle C, Concord E, Vernet T, Gulino D. Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca²⁺-dependent hexameric structure. *J Biol Chem*. **276** (5), 3581-3588 (2001)

[Lenne 1998] Lenne, P.-F. Deux exemples de cristallisation à la surface de l'eau: cristaux 2-D de protéines, monocouches d'alcools en présence d'amphiphiles solubles. *Thèse de doctorat de physique, discipline : physique de la matière et du rayonnement*. Université Joseph Fourier, Grenoble 1. (1998).

[Lenne 2000] Lenne P.-F., Berge B, Renault A, Zakri C, Vénien-Bryan C, Courty S., Balavoine F, Bergsma-Schutter W, Brisson A, Grubel G, Boudet N, Konovalov O, Legrand J.-F. Synchrotron radiation diffraction from two-dimensional protein crystals at the air/water interface. *Biophys J* **79**(1), 496-500 (2000)

[Liedberg 1995] Liedberg B., Nylander C., Lundström I. Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started. *Biosensor Bioelec.* **10**, i-ix, (1995).

[Lösche 2002] Lösche, M. Surface-Sensitive X-Ray and Neutron Scattering Characterization of Planar Lipid Model Membranes and Lipid/Peptide Interactions. *Curr Topics in Membranes*, **52**, (2002).

[Martel 2002] Martel L., Johnson C., Boutet S., Al-Kurdi R., Konovalov O., Robinson I., Leckband D., Legrand J.-F. X-ray reflectivity investigations of two-dimensional assemblies of C-cadherins: First steps in structural and functional studies. *J. Phys. IV*, **12**, 365-377 (2002).

[Mårtensson 1995] Mårtensson J., Arwin H. Interpretation of Spectroscopic Ellipsometry Data on Protein Layers on Gold Including Substrate-Layer Interactions. *Langmuir*, **11**(3), 963-968 (1995).

[Martín-Benito 2000] Martín-Benito J., Gavilans F., de los Rios V., Mancheño J. M., Fernández J. J., Gavilanes J. G. Two-dimensional crystallization on lipid monolayers and three-dimensional structure of Sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* **78**, 3486-3194 (2000).

[Maxwell Garnet 1904] Maxwell Garnet, J. C. *Phil. Trans.* **203**, 385 (1904).

[McCrackin 1969] McCrackin, F. L. *Nat. Bur. Stand. Tech. Note* **479** (1969).

[Meunier 2000] Meunier, J. Why a Brewster angle microscope? *Coll. Surf. A* **171**, 33-40, (2000).

[Mitric 2001] Mitric A. Etude de protéines du complexe NADPH Oxydase. Cristallisation à deux et trois dimensions. *Stage de DEA Méthodes Physiques Expérimentales et Instrumentation*. Université Joseph Fourier Grenoble. (2001).

[Modine 1983] Modine F.A., Jellison G.E., Gruzalski G.R. Errors in ellipsometry measurements made with a photoelastic modulator. *J. Opt. Soc. Am.* **73**(7), 892-900 (1983).

[Möhwald 1995] Möhwald, H., Baltes, H., Schwendler, M., Helm, C. A., Brezesinski, G., Haas H. Phospholipid and Protein Monolayers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **34**, 3906-3913 (1995)

[Mozzaffary 1994] Mozzaffary, H. Cholesterol-phospholipid interaction : a monolayer study. *Thin Solid Films*, **244**, 874-877 (1994)

[Muller 1998] Muller, D. Malmsten M., Bergenstahl B., Hessing J., Olijve J., Mori F. Competitive Adsorption of Gelatin and Sodium Dodecylbenzenesulfonate at Hydrophobic Surfaces. *Langmuir*, **14**(11), 3107-3114 (1998).

[Nagar 1996] Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., Rini, J. M. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, **380**, 360 (1996)

[Névot 1980] Névot, L., Croce, P. Caractérisation des surfaces par réflexion rasante de rayons X. Application à l'étude du polissage de quelques verres silicates. **15**, 761-779 (1980).

[Niessen 2002] Niessen CM, Gumbiner BM. Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol.* **156**(2), 389-399. (2002).

[Nose 1988] Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* **54**(7), 993-1001. (1988).

[Otto 1968] Otto, A. Exitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z Phys.* **216**, 398-410 (1968).

[Overduin 1995] Overduin, M., Harvey, T. S., Bagby, S., Tong, K. I. Yau, P., Takeichi, M., Ikura, M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science*. **267**, 386 (1995)

[Ozawa 1998] Ozawa M, Kemler R. The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J Cell Biol.* **142**(6), 1605-1613. (1998).

[Parratt 1954] Parratt L. G. Surface studies of solids by total reflection of X-rays. *Phys. Rev.* **95**, 359-369, (1954).

[Parratt32] Programme d'ajustement des données de réflectivité du Hahn-Meitner-Institute, Berlin. Disponible sur <http://www.hmi.de/bensc/software/refl/parratt/parratt.html> (consulté le 27 septembre 2002)

[PDB] The Protein Data Bank. Base de données en ligne des structures des macromolécules biologiques. Disponible sur <http://www.pdb.org/> (consulté le 26 septembre 2002).

[Peanasky 1995] Peanasky J., Schneider H.M., Granick S., Kessel C.R. Self-Assembled Monolayers on Mica for Experiments Utilizing the Surface Forces Apparatus. *Langmuir*. **11**(3), 953-962 (1995).

[Perkins 1994] Perkins G. A., Bergsma-Schutter W., Keegstra W., Arnberg A. C., Coux O., Scherrer K. The 1,5-nm projection structure of HeLa cell prosome-MCP (proteasome) provided by two-dimensional crystals. *J. Struct. Biol.* **113**, 124-134 (1994).

[Pertz 1998] Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A., Engel, J. A new crystal structure, Ca^{2+} dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cad homoassociation. *EMBO*. **18**, 1738 (1998)

[ProtParam] ProtParam Tool. Programme d'analyse des séquences d'acides aminés. Disponible sur <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> (consulté le 17 octobre 2002).

[Reiter 1993] Reiter R., H. Motschmann, W. Knoll. Ellipsometric characterization of streptavidin binding to biotin-functionalized lipid monolayers at the water/air interface. *Langmuir*. **9**(9), 2430-2435, (1993).

[Renaud-Young 2002] Renaud-Young M, Gallin W. J. E-cadherin EC1: heterophilic interactions, but not the conserved HAV motif, are required for adhesion. *J. Biol. Chem.* In press. (2002).

[Renault 1999] Renault A., Lenne P.-F., Zakri C., Aradian A., Vénien-Bryan C., Amblard F. Surface-Induced Polymerization of Actin. *Biophys. J.* **76**(3), 1580-1590 (1999).

[Reviakine 1998] Reviakine, I, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged in Situ by AFM. *J Struct Biol.* **121**(3), 356-361. (1998).

[Rieu 1995] Rieu, J.-P. Contribution à l'étude de la fusion cristallisation des monocouches d'alcools courts à la surface de l'eau. *Thèse de doctorat de physique, discipline : physique de la matière condensée*. Université Joseph Fourier, Grenoble 1. (1995).

[Robers 1999] Robers, M., Rensink IJ, Hack CE, Aarden LA, Reutelingsperger CP, Glatz JF, Hermens WT. A new principle for rapid immunoassay of proteins

based on in situ precipitate-enhanced ellipsometry. *Biophys. J.* **76**(5):2769-76 (1999).

[Rossow 1996] Rossow, U., Richter W. Spectroscopic Ellipsometry. In "Optical characterization of epitaxial semiconductor layers". (G. Bauer and W. Richter Eds.). (1996).

[Rothen-Rutishauser 2002] Rothen-Rutishauser B, Riesen FK, Braun A, Gunthert M, Wunderli-Allenspach H. Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *J Membr Biol.* **188**(2), 151-162. (2002).

[Saito 1996] Saito W., Kawaguchi M., Kato T., Imae T. Spreading solvent and temperature effects on interfacial properties of poly(*N*-isopropylacrylamide) films at the air-water interface. *Langmuir.* **12**(24), 5947-5950 (1996).

[Sauvage-Simkin 1994] Sauvage-Simkin, M. Surfaces and interfaces: X-ray studies. In "Neutron and synchrotron radiation for condensed matter studies" (Baruchel, J., Hodeau, J.-L., Lehmann, M. S., Regnard, J.-R., Schlenker, C. Ed.). *Les éditions de physique – Springer Verlag.* Vol. **3**. (1994).

[Saxena 1965] Saxena, A. N. Changes in the phase and amplitude of polarized light reflected from a film-covered surface and their relations with the film thickness. *J. Opt. Soc. Am.* **55**(9), 1061-1067. (1965).

[Schalke 2000] Schalke M., Krüger P., Weygand M., Lösche M. Submolecular organization of DMPA in surface monolayers: beyond the two-layer model. *BBA - Biomembranes* **1464** (1), 113-126 (2000).

[Scheuring 2002] Scheuring S., Muller D. J. , Stahlberg H., Engel H. A., Engel A. Sampling the conformational space of membrane protein surfaces with the AFM. *Eur Biophys J.* **31**(3), 172-178. (2002).

[Schmitt 1994] Schmitt L., Dietrich C., Tampé R. Synthesis and characterization of chelator-lipids for reversible immobilization of engineered proteins at self-assembled lipid interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 8485-8491 (1994).

[Schmitt 2000] Schmitt L, Ludwig M, Gaub HE, Tampe R. A metal-chelating microscopy tip as a new toolbox for single-molecule experiments by atomic force microscopy. *Biophys J.* **78**(6), 3275-85, (2000).

[Shan 2000] Shan WS, Tanaka H, Phillips GR, Arndt K, Yoshida M, Colman DR, Shapiro L. Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J Cell Biol.* **148**(3), 579-90, (2000).

[Shapiro 1995] Shapiro L., Fanon., A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grubel, G., Legrand, J.-F., Als-Nielsen, J. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature.* **374**, 327 (1995)

[Sivasankar 1999] Sivasankar, S. Brieher, W., Lavrik, N., Gumbiner, B., Leckband, D. Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **96**, (21), 11820-11824 (1999).

[Sivasankar 2001a] Sivasankar, S. Mecanism of C-cadherin unbinding: multiple adhesive alignments and a multi-stage unbinding trajectory. *PhD thesis in biophysics and computational biology.* University of Illinois at Urbana-Champaign, Etats-Unis. (2001)

[Sivasankar 2001b] Sivasankar, S., Gumbiner, B., Leckband, D. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J.* **80**, 1758-1768 (2001).

[Small 1986] Small D. The Physical Chemistry of Lipids. In "Handbook of Lipid Research". Vol 4. (D. Hanahan Ed.) *Plenum Press*. (1986).

[Stchakovsky 1991] Stchakovsky M. Conception et réalisation d'un ellipsomètre spectroscopique à modulation de phase. Application à l'étude d'interfaces de matériaux en couches minces. *Thèse de doctorat en science*. Université de Paris-Sud (1991).

[Steinberg 1999] Steinber, M. S., McNutt, P. M. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 554-560 (1999).

[Takeichi 1991] Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. **251**, 1451-1455 (1991).

[Takeichi 1993] Takeichi, M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Biol.* **5**, 806-811 (1993).

[Tamura 1998] Tamura, K., Shan, W.-S., Hendrickson, W. A., Colman, D. R., Shapiro, L. Structure-function analysis of neural (N-) cadherin. *Neuron*. **20**, 1153 (1998)

[Tepass 1999] Tepass, U. Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 540-548 (1999).

[Timperley 2002] Timperley, A., Using surface plasmon resonance to study the immobilisation of avidin onto a film of polypyrrol biotin. *Master of Science Physics*, Imperial College, Londres, Royaume-Uni, (2002).

[Tompkins 1993] Tompkins, H. "A user's guide to ellipsometry". *Academic Press, Inc* (1993).

[Tomschy 1996] Tomschy A, Fauser C, Landwehr R, Engel J. Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *EMBO J.* **15** (14), 3507-3514 (1996)

[Trojanovski 1999] Trojanovski, S. M. Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 561-566 (1999).

[Uzgiris 1983] Uzgiris, EE, Kornberg, RD. Two-dimensional crystallization technique for imaging macromolecules, with application to antigen—antibody—complement complexes. *Nature*. **301**, 125-129 (1983).

[Vaknin 2001] Vaknin, D. X-ray diffraction techniques to characterize liquid surfaces and monomolecular layers at gas-liquid interfaces. */cond-mat/0101142* (2001).

[Vénien-Bryan 1997] Vénien-Bryan C, Balavoine F, Toussaint B, Mioskowski C, Hewat EA, Helme B, Vignais PM. Structural study of the response regulator HupR from *Rhodobacter capsulatus*. Electron microscopy of two-dimensional crystals on a nickel-chelating lipid. *J Mol Biol.* **274**(5), 687-92 (1997).

[Vénien-Bryan 1998] Vénien-Bryan C., Lenne P.-F., Zakri C., Renault A., Brisson A., Legrand J.-F., Berge B.. Characterization of the Growth of 2D Protein Crystals on a Lipid Monolayer by Ellipsometry and Rigidity Measurements Coupled to Electron Microscopy. *Biophys J.* **74**(5), 2649-2657 (1998).

[Vineyard 1982] Vineyard G.H. Grazing-incidence diffraction and the distorted-wave approximation for the study of surfaces. *Phys. Rev. B.* **26** (8), 4146–4159 (1982).

[Vleminckx 1999] Vleminckx, K. Kemler, R. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signal. *BioEssays.* **21**, 221-220 (1999).

[Vork 1990] Vork F.T.A., Schuermans B.C.A.M., Barendrecht E. Influence of inserted anions on the properties of polypyrrole. *Electrochimica Acta.* **35** (2), 567-575 (1990).

[Weik 2000] Weik M, Ravelli RB, Kryger G, McSweeney S, Raves ML, Harel M, Gros P, Silman I, Kroon J, Sussman JL. Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci.* **97**(2), 623-628. (2000).

[Weis 1995] Weis WI. Cadherin structure: a revealing zipper. *Structure.* **3**(5), 425-427. (1995).

[Weygand 1999] Weygand M., Wetzer B., Pum D., Sleytr A. B., Cuvillier N., Kjaer K., Howes P. B., Lösche M. Bacterial S-layer protein coupling to lipids : X-ray reflectivity and grazing incidence diffraction studies. *Biophys. J.* **76**, 458-468, (1999).

[Weygand 2000] Weygand M. Struktur und mikroskopische Charakterisierung der Wechselwirkung von S-Schicht-Proteinen mit Phospholipiden: Röntgen- und Neutronenstreuuntersuchungen. *PhD thesis in physics.* Universität Leipzig, Allemagne. (2000).

[Weygand 2002] Weygand M., Kjaer K., Howes P. B., Wetzer B., Pum D., Sleytr A. B., Lösche M. Structural reorganization of phospholipid headgroups upon recrystallisation of an S-layer lattice. *J. Phys. Chem. B* **106**, 5793-5799, (2002).

Méthodes d'analyse de surface appliquées à l'étude de protéines d'adhérence cellulaire

L'immobilisation de protéines ancrées à des lipides à l'interface air-eau ou solide-eau permet aux protéines d'interagir avec des molécules en solution. Dans le cas des cadhérines, protéines d'adhérence cellulaire, ce système mime la surface d'une cellule. Les interactions entre domaines extracellulaires de cadhérines nécessitent la présence d'ions calcium. Des monocouches de C-cadhérine et de VE-cadhérine formées à la surface de l'eau ont été étudiées en variant la concentration en calcium de la solution. La densité massique surfacique apparente de protéines a été évaluée par ellipsométrie. Le profil de densité électronique des monocouches a été déterminé par réflectivité des rayons X en incidence rasante. Les résultats obtenus suggèrent que les cadhérines forment des complexes anti-parallèles pouvant en partie être dissociés par l'appauvrissement de la solution en calcium. La résonance des plasmons de surface a permis d'évaluer la densité de molécules déposées sur un substrat solide.

Mots-clés : Ellipsométrie, Réflectivité des Rayons X, Cadhérine, Résonance des Plasmons de Surface, Monocouches, Phospholipides, Adhérence Cellulaire.

Surface Analytical Methods for the Study of Cell Adhesion Proteins

The immobilization of proteins anchored to lipids at the air-water or solid-water interface let the proteins interact with other molecules in solution. In the case of the cell adhesion proteins named cadherins, this system mimics the surface of a cell. The interactions between the extracellular domains of cadherins require the presence of calcium ions. Monolayers of C-cadherin and VE-cadherin formed at the surface of water were studied by varying the calcium concentration. The apparent surface mass density of proteins was evaluated by ellipsometry. The electronic density profile of monolayers was determined by grazing incidence x-ray reflectivity. The results obtained suggest that the cadherins form anti-parallel complexes which can be partly dissociated by reducing the calcium concentration. Surface plasmons resonance was also used to evaluate the surface density of molecules deposited on a solid substrate.

Keywords : Ellipsometry, X-ray Reflectivity, Cadherin, Surface Plasmon Resonance, Monolayers, Phospholipids, Cell Adhesion.

Thèse préparée au Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée

Laboratoire Structure et Propriétés des Architectures Moléculaires

UMR 5819 CNRS-UJF-CEA Grenoble